

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-179352

(43) 公開日 平成7年(1995)7月18日

| | | | | |
|---------------------------|---------|---------|------------------|--------------------|
| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| A 6 1 K 35/26 | A D U | 7431-4C | | |
| 35/28 | | 7431-4C | | |
| 51/00 | | | | |
| | | | A 6 1 K 49/ 02 | C |
| | 7729-4B | | C 1 2 N 5/ 00 | E |
| | | | 審査請求 未請求 請求項の数66 | FD (全 34 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平6-187828

(22) 出願日 平成6年(1994)7月18日

(31) 優先権主張番号 0 9 3 0 8 8

(32) 優先日 1993年7月16日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(31) 優先権主張番号 2 7 1 9 0 2

(32) 優先日 1994年7月13日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 593172050

ジ・オハイオ・ステイト・ユニバーシテ
ィ・リサーチ・ファウンデーション
THE OHIO STATE UNIV
ERSITY RESEARCH FOU
NDATION
アメリカ合衆国43210オハイオ州コロンバ
ス、ケニー・ロード1960番

(74) 代理人 弁理士 明石 昌毅

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍反応性細胞の豊富なリンパ節を用いた養子細胞療法に於ける治療薬とその方法

(57) 【要約】

【目的】養子免疫療法に於いてガンを有する患者の生存を改善すること。

【構成】本発明では、新生組織により生成された若しくはそれに関連したマーカーに特異的に結合する放射性標識されたロケータを患者へ投与し、放射性ロケータが新生組織に優先的に集中し、結合されていない放射性標識されたロケータが患者から浄化されて背景の光子放出に対する新生組織からの光子放出の比が増大するよう時間を経過させた後放射線検出プローブで放射性標識されたロケータの付加を示すリンパ節部位を決定して除去し、その内の視覚的に腫瘍の証拠のない節を、分裂促進刺激を与えて培養し、その中のCD4+腫瘍特異リンパ球を含む腫瘍特異リンパ球を増殖して養子免疫療法のための患者に投与される治療薬とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】CD4+腫瘍特異リンパ球を含む腫瘍特異リンパ球の豊富なリンパ節を決定する方法であって、

(a) 新生組織により生成された若しくはそれに関連したマーカーに特異的に結合する有効な量の放射性標識されたロケータを患者へ投与する過程と、

(b) (a)の過程に続いて、前記患者に於て前記放射性ロケータが新生組織に優先的に集中し、結合されていない放射性標識されたロケータが浄化されて前記患者に於ける背景の光子放出に対する新生組織からの光子放出の比が増大するよう時間を経過させる過程と、

(c) (b)の過程に於て前記時間が経過させられた後に、放射線検出プローブをもって前記放射性標識されたロケータの付加を示すリンパ節部位を該リンパ節部位に於て放射線のレベルが増大していることを検出することによって決定するべく前記放射線検出プローブをもって前記患者を調べる過程と、

(d) (c)の過程に於て決定されたリンパ節を除去する過程と、

(e) 前記の除去されたリンパ節のうち腫瘍の証拠を視覚的に含んでいないリンパ節を選択する過程と、

(f) (e)の過程に於て選択された前記リンパ節を培養しその中に於て腫瘍特異リンパ球を増殖する過程とを含む方法。

【請求項2】請求項1による方法であって、前記(d)の過程に於て除去されたリンパ節が視診及び触診によって巨視的な腫瘍を含んでいないと確認されたリンパ節である方法。

【請求項3】請求項1による方法であって、前記選択されたリンパ節が前記(f)の過程に於て分裂促進刺激によって培養される方法。

【請求項4】請求項3による方法であって、前記(f)の過程に於ける前記リンパ節がインターロイキン-2及び抗CD₃モノクローナル抗体の存在下に於て培養される方法。

【請求項5】請求項4による方法であって、前記培養の過程に於て腫瘍関連糖蛋白質(TAG)抗原が含まれている方法。

【請求項6】請求項4による方法であって、前記培養の過程に於て、更にオートローガス新生組織若しくは異型的新生組織の一つ若しくはそれ以上含む新生組織が含まれている方法。

【請求項7】請求項4による方法であって、前記インターロイキン-2の量が約10 u/mlと500 u/mlの間の範囲であり、前記抗CD₃モノクローナル抗体の濃度が約10 ng/mlと500 ng/mlの間の範囲である方法。

【請求項8】請求項6による方法であって前記新生組織が前記(f)の培養する過程に先立って不活性化されている方法。

【請求項9】請求項8による方法であって、前記新生組

織が不活性化されるべく放射線源により照射されている方法。

【請求項10】請求項1による方法であって、前記

(e)過程に於て選択された前記リンパ節中のCD4+細胞が(f)の過程に於て培養されるべく分離される方法。

【請求項11】請求項1による方法であって前記(f)の過程に於て培養された前記リンパ球が脾臓リンパ球に由来する方法。

【請求項12】請求項1による方法であって、前記ロケータがポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、それらのキメラ型、それらの人型、それらの一本鎖抗体、若しくはペプチドのうちの一つ若しくはそれ以上である方法。

【請求項13】請求項1による方法であって前記ロケータがA₆B₇モノクローナル抗体、CC49モノクローナル抗体、CC83抗体及びそれらの組合せから選択される方法。

【請求項14】請求項1による方法であって前記放射性標識されたロケータが前記放射線検出プローブによって検出されるガンマ放射線若しくはベータ放射線を放射する方法。

【請求項15】請求項14による方法であって前記放射性標識されたロケータが約550 keVを越えない選択されたエネルギーレベルを呈する方法。

【請求項16】請求項15による方法であって前記放射性標識されたロケータが¹²⁵Iを含む方法。

【請求項17】請求項1による方法であって前記放射性標識されたロケータが¹²⁵Iを含む方法。

【請求項18】請求項4による方法であって、前記放射性標識されたロケータが¹²⁵Iを含む方法。

【請求項19】請求項1による方法であって、前記患者が(c)の過程に於て手にて所持され得る携帯用の放射線検出プローブをもって外科的に調べられる方法。

【請求項20】請求項1による方法であって前記患者が(c)の過程に於て内視鏡若しくは腹腔鏡をもって調べられる方法。

【請求項21】請求項1による方法であって前記放射線検出プローブが放射線のレベルが上昇した部分が存在することに応答する音発生器に結合されている方法。

【請求項22】請求項1による方法であって(b)の過程に於ける前記比が約1.5:1以上である方法。

【請求項23】請求項4による方法であって前記患者が(c)の過程に於て内視鏡若しくは腹腔鏡をもって調べられる方法。

【請求項24】請求項1による方法であって前記(f)の過程の前記増殖されたリンパ節が前記患者へ投与される方法。

【請求項25】請求項7による方法であって前記(f)の過程の前記増殖されたリンパ節が前記患者へ投与され

る方法。

【請求項 26】請求項 9 による方法であって前記 (f) の過程の前記増殖されたリンパ節が前記患者へ投与される方法。

【請求項 27】腫瘍を有する患者に於ける腫瘍の発達を軽減するのに有効な治療薬であって、調合上許容し得る担体に於て、患者から切除された CD4+腫瘍特異リンパ球を含む腫瘍特異リンパ球の豊富なリンパ節であって、それらが増加するべく分裂促進刺激を受けているリンパ節を含む治療薬。

【請求項 28】請求項 27 による治療薬であって前記リンパ節がインターロイキン-2 及び抗 CD₃ モノクローナル抗体の存在下にて培養されたものである治療薬。

【請求項 29】請求項 28 による治療薬であって、前記リンパ節の培養に於て腫瘍関連糖蛋白質 (TAG) 抗原若しくは新生組織のうちの一つもしくはそれ以上を含んでいる治療薬。

【請求項 30】請求項 29 による治療薬であって、前記リンパ節を培養する際にオートローガス新生組織若しくは異型的新生組織のうちの一方若しくはそれ以上を含む新生組織が含まれている治療薬

【請求項 31】請求項 28 による治療薬であって、前記インターロイキン-2 の量が約 10 u/ml と 500 u/ml の間の範囲であり、前記抗 CD₃ モノクローナル抗体の濃度が約 10 ng/ml と 500 ng/ml の間の範囲である治療薬。

【請求項 32】請求項 30 による治療薬であって前記新生組織が前記リンパ節と共に培養される前に先立って不活性化されている治療薬。

【請求項 33】請求項 32 による治療薬であって、前記新生組織が不活性化されるべく放射線源によって照射されている治療薬。

【請求項 34】請求項 27 による治療薬であって、前記リンパ節が脾臓リンパ球に由来する治療薬。

【請求項 35】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の退行を行うための方法であって、有効な量の請求項 27 に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項 36】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の退行を行うための方法であって、有効な量の請求項 28 に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項 37】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の退行を行うための方法であって、有効な量の請求項 29 に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項 38】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の退行を行うための方法であって、有効な量の請求項 33 に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項 39】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の退行を行うための方法であって、有効な量の請求項 34 に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項 40】請求項 35 による方法であって前記患者

がその後補助的な化学療法を受ける方法。

【請求項 41】患者から切除された CD4+腫瘍特異リンパ球を含む腫瘍特異リンパ球の豊富なリンパ節を含むリンパ節を培養する方法であって、

(a) 前記切除されたリンパ節からリンパ節リンパ球 (LNL) を分離する過程と、

(b) 前記 LNL を分裂促進刺激状態下にて培養し前記 LNL を増加する過程と

(c) その後前記分裂促進刺激を低減する過程と、

10 を含む方法。

【請求項 42】請求項 41 による方法であって前記 LNL がインターロイキン-2 (IL-2)、抗 CD₃ モノクローナル抗体、及び腫瘍関連糖蛋白質 (TAG) 抗原の存在下にて培養される方法。

【請求項 43】請求項 42 による方法であって、前記インターロイキン-2 の量が約 10 u/ml と 500 u/ml の間の範囲であり、前記抗 CD₃ モノクローナル抗体の濃度が約 10 ng/ml と 500 ng/ml の間の範囲である方法。

【請求項 44】請求項 42 による方法であって前記 IL-2 と溶解性である前記抗 CG₃ が前記 LNL に同時に加えられる方法。

【請求項 45】請求項 41 による方法であって前記 LNL がマクロファージ媒体中に於て培養される方法。

【請求項 46】請求項 45 による方法であって前記媒体が血清のない媒体である方法。

【請求項 47】患者から切除された腫瘍活性細胞の豊富なリンパ節を含むリンパ節を培養する方法であって、

(a) 前記切除されたリンパ節から腫瘍反応性細胞を分離する過程と、

(b) 前記腫瘍反応性細胞を分裂促進刺激条件下のもとで培養し前記腫瘍反応性細胞を増加する過程と、

(c) その前記分裂促進刺激を低減する過程とを含む方法。

【請求項 48】請求項 47 による方法であって前記腫瘍反応性細胞がインターロイキン-2 (IL-2)、抗 CD₃ モノクローナル抗体、及び腫瘍関連糖蛋白質 (TAG) 抗原の存在下にて培養される方法。

【請求項 49】請求項 48 による方法であって、前記インターロイキン-2 の量が約 10 u/ml と 500 u/ml の間の範囲であり、前記抗 CD₃ モノクローナル抗体の濃度が約 10 ng/ml と 500 ng/ml の間の範囲である方法。

【請求項 50】請求項 48 による方法であって前記 IL-2 と溶解性である前記抗 CG₃ が前記 LNL に同時に加えられる方法。

【請求項 51】請求項 47 による方法であって前記腫瘍反応性細胞がマクロファージ媒体中に於て培養される方法。

【請求項 52】請求項 51 による方法であって前記媒体

が血清のない媒体である方法。

【請求項53】腫瘍を有する患者に於ける腫瘍の発達を軽減するのに有効な治療薬であって、調合上許容し得る担体に於て、患者から切除された腫瘍反応性細胞の豊富なリンパ節であって、それらが増加するべく分裂促進刺激を受けているリンパ節を含む治療薬。

【請求項54】請求項53による治療薬であって前記リンパ節がインターロイキン-2及び抗CD₃モノクローナル抗体の存在下にて培養されたものである治療薬。

【請求項55】請求項54による治療薬であって、前記リンパ節の培養に於て、腫瘍関連糖蛋白質(TAG)抗原若しくは新生組織のうちの一つもしくはそれ以上を含んでいる治療薬。

【請求項56】請求項55による治療薬であって、前記リンパ節を培養する際にオートローガス新生組織若しくは異型的新生組織のうち的一方若しくはそれ以上を含む新生組織が含まれている治療薬

【請求項57】請求項54による治療薬であって、前記インターロイキン-2の量が約10 u/mlと500 u/mlの間の範囲であり、前記抗CD₃モノクローナル抗体の濃度が約10 ng/mlと500 ng/mlの間の範囲である治療薬。

【請求項58】請求項56による治療薬であって前記新生組織が前記リンパ節と共に培養される前に先立って不活性化されている治療薬。

【請求項59】請求項58による治療薬であって、前記新生組織が不活性化されるべく放射線源によって照射されている治療薬。

【請求項60】請求項53による治療薬であって、前記リンパ節が脾臓由来のリンパ節である治療薬。

【請求項61】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の発達を抑えるための方法であって、有効な量の請求項53に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項62】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の発達を抑えるための方法であって、有効な量の請求項54に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項63】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の発達を抑えるための方法であって、有効な量の請求項55に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項64】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の発達を抑えるための方法であって、有効な量の請求項59に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項65】腫瘍を有する患者に於て腫瘍の発達を抑えるための方法であって、有効な量の請求項60に記載された治療薬を前記患者へ投与することを含む方法。

【請求項66】請求項61による方法であって前記患者がその後補助的な化学療法を受ける方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、養子免疫療法及び治療

薬に係り、一層詳細には、腫瘍反応性細胞の豊富なリンパ節の決定、腫瘍反応性細胞の増殖及びそれらの養子免疫療法に於ける使用に係る。

【0002】

【従来の技術】本明細書に於て以下の略記号が用いられる。

| | |
|------------------|---|
| LNL | リンパ節リンパ球 |
| PBL | 末梢血リンパ球 |
| TIL | 腫瘍浸透リンパ球 |
| LAK | リンホカイン活性化キラー |
| IL-2 | インターロイキン2 |
| 抗CD ₃ | 抗CD ₃ モノクローナル抗体(表中ではAnti-CD ₃) |
| CC49 | CC49モノクローナル抗体 |
| TAG | 腫瘍関連糖蛋白質 |
| Auto | オートローガス |
| Allo | 異型的 |
| Glio | ヒトグリオームの培養された細胞系統 |
| CAR1 | ヒトカルシノイド腫瘍 |
| CEA | ガン胎児性抗原 |
| Mo AB | モノクローナル抗体 |
| BSM | ウシ上顎下粘液 |
| PBMC | 末梢血単核細胞 |

WD124 培養されたヒト結腸ガン腫細胞系統
結腸直腸ガンと診断された患者の約50%に於て、結腸若しくは直腸の外側に転移性の疾患が進行する。かかる疾患は、肝外性であると同時に肝内性である場合があるので、二次的な外科的処置ではこれらの患者の多くが治療されない。この疾患を有する患者の生存を改善するために更なる治療が必要とされる。

【0003】養子免疫療法は、ガンの治療に於て興味ある治療様式を提供する。インターロイキン2(IL-2)の如きリンホカイン及び患者の末梢血に由来するリンホカイン活性化キラー細胞(LAK)を用いて、ロゼンバーク等(Rosenberg, et al.)は、少ないが有意なパーセンテージの黒色腫及び腎細胞ガンを有する患者が長期間応答することを示した(Rosenberg, et al. "Adoptive Cellular Therapy: Clinical Applications", Biologic Therapy of Cancer, DeVita, et al. (Eds), J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., (1991))。腫瘍からのリンパ球を培養に於て増加するべく養子免疫療法についての第二の試みが成された(Rosenberg, "Adoptive Cellular Therapy: Clinical Applications", Biologic Therapy of Cancer, DeVita, et al. (Eds), J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., p. 241(1991); Topalian, et al. "Tumor Infiltrating Lymphocytes: Evidence of Specific Immune Reactions Against Growing Cancers in Mice and Human", Important Advances in Oncology 1990, DeVita, et al. (Eds), J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Pa., p. 19

(1990) 及び Rosenberg, et al., "Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma", *N. Engl. J. Med.*, 25:1671, 1988)。幾つかの研究グループは、腫瘍浸透リンパ球 (TIL) を用いて、包括的な腫瘍細胞溶解活性を示し、これらの TIL 細胞の腫瘍に対する作用が LAK 細胞よりもより良いということを示した (Rosenberg, et al., *N. Engl. J. Med.*, id; Dillman, et al., "Continuous Interleukin-2 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Treatment of Advanced Melanoma", *Cancer*, 68:1, 1991; Kradin, et al., "Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Interleukin-2 in Treatment of Advanced Cancer", *Lancet*, 33:577, 1989; 及び Bukowski, et al., "Clinical Results and Characterization of Tumor-Infiltrating Lymphocytes with or without Recombinant Interleukin-2 in Human Metastatic Renal Cell Carcinoma", *Cancer Res.* 51:4199, 1991。)。全体として、これらの TIL 細胞は、黒色腫を有する患者に対して治療学的に有効であるように見える。腫瘍浸透リンパ球は、結腸ガン及び乳ガンを含む多くの充実性腫瘍から生成されている。しかしながら、これらの細胞は *in vitro* 腫瘍特異細胞溶解活性を成すようには見えず、また、養子免疫療法のモデルに於てこれらの細胞が有効であるかどうかは決定されるべき問題として残っている (Rosenberg, "Gene Therapy of Cancer", *Important Advances in Oncology*, 1992, DeVita, et al. (Eds), J. B. Lippincott Co., New York, NY, pp17-18, 1992)。

【0004】腫瘍特異リンパ球を用いた腫瘍治療法についてのもう一つの興味ある試みは、腫瘍に対し局所的にサイトカインを供給することのできる細胞内にサイトカイン遺伝子を配置することである。 (Kasid, et al., "Human Gene Transfer: Characterization of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes as Vehicles for Retroviral-Mediated Gene Transfer in Man", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:473-477, 1990 及び Rosenberg, et al., "Gene Transfer into Humans: Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma Using Tumor Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction", *New Engl. J. Med.*, 323:570-578, 1990)。幾つかのモデル系に於て、IL-2、ガンマインターフェロン及び腫瘍壊死因子 (TNF) を含む種々のサイトカイン遺伝子を感染させられた腫瘍細胞がサイトカインを生成しない母細胞よりも免疫原性があり腫瘍発生性が少ないということが示された (Gansbacher, et al. "Retroviral Vector-Mediated Gamma Interferon Gene Transfer into Tumor Cells Generates Potent and Long Lasting Antitumor Immunity", *Cancer Res.* 50:7820-7825, 1990; Gansbacher, et al., "Interleukin 2 Gene Transfer into Tumor Cells Abrogates Tumorigenicity and Induces Protective Immunity", *J. Exp. Med.*, 172:1217-1224, 1990; 及び Blanke

nstein, et al., "Tumor Suppression after Tumor Cell-Targeted Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Transfer", *J. Exp. Med.* 173:1047-1052, 1991。)。このことは、腫瘍細胞の近くでサイトカインを局所的に生成することが腫瘍の成長を阻害し免疫応答を刺激することによって有利に影響していることということを示唆する。実際、腫瘍を認識し腫瘍に应答して種々のサイトカインを分泌することのできるリンパ球を見出し、それらの細胞を養子免疫療法に用いることは有用であろう。最近では、ガンマインターフェロンと TNF- α を分泌する或る TIL 細胞が *in vitro* に於て直接的な腫瘍細胞毒性を示さないが、*in vivo* に於て腫瘍の後退を媒介するということが示されている (Barth, et al., "Interferon-Gamma and Tumor Necrosis Factor Have a Role in Tumor Regression Mediated by Murine CD 3^{+} Tumor-Infiltrating Lymphocytes", *J. Exp. Med.*, 173:647, 1991)。

【0005】乳ガン、結腸直腸ガンの如き殆んどの充実性腫瘍から TIL 細胞を得ることの難しさ、これらの状況下に於て増加するリンパ球の形式及び TIL 細胞を生成するのに必要な培養時間が長期間であることを含む幾つかの問題によって、多くの腫瘍に対して広く適用することが制限されている。腫瘍リンパ球を得るもう一つの源は、リンパ節であろう。幾つかの研究室は、胸部、頭部、頸部、脾臓及び結腸を含むガン患者からの所属リンパ節に於ける腫瘍特異免疫応答を示している (Hoover, et al., "Activation and In Vitro Expansion of Tumor-Reactive T Lymphocytes from Lymph Nodes Draining Human Primary Breast Cancers", *J. Surg. Oncol.*, 46:117, 1991; Cozzolino, et al., "Characterization of Cells from Invaded Lymph Nodes in Patients with Solid Tumors, Lymphokine Requirement for Tumor-Specific Lymphoproliferative Response", *J. Exp. Med.*, 166:303, 1987; Brand, et al., "Specific, Major Histocompatibility Complex-Unrestricted Recognition of Tumor-Associated Mucins by Human Cytotoxic T-cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7159-7163, 1989 及び Vose, et al., "Tumor Reacting Lymphocytes Stimulated in Mixed Lymphocyte and Tumor Culture", *Cancer Immunol. and Immunother.*, 15:227-236 (1983))。実験動物のモデルに於て、所属リンパ節は、*in vitro* に於て増加された際に実験的な転移を除去することのできる腫瘍特異前エフェクター細胞を含むことが示されている (Yoshizawa, et al., "Activation by Anti-CD 3 of Tumor-Draining Lymph Node Cells for Specific Adoptive Immunotherapy", *Cell Immunol.*, 134:473, 1991; 及び Yoshizawa, et al., "Specific Adoptive Immunotherapy Mediated by Tumor-Draining Lymph Node Cells Sequentially Activated by Anti-CD 3 and IL-2", *J. Immunol.*, 147:729, 1991)。動物のモデルに於て、リンパ節除去の時期及び一次腫瘍の大きさは、前エフェクターリンパ球を検出する

ことができるどうかに於て重要な要因である (Yoshizawa, et al., "Activation by Anti-CD₃ of Tumor-Draining Lymph Node Cells for Specific Adoptive Immunotherapy, supra; 及び Sakai, et al., "Phenotype Analysis in Cellular Mechanisms of Pre-Effector T-Lymphocyte Response to a Progressive Syngeneic Murine Sarcoma". Cancer Res., 50:4371-4376, 1990)。これらのリンパ球は、また、in vitroに於て腫瘍の刺激のないところで抗CD₃ 及びIL-2を用いることにより増加することができる。もしヒトに於て同定されれば、前エフェクターリンパ球は、養子免疫療法に於て潜在的に価値のある細胞となろう。ヒトに於て、腫瘍特異免疫応答を確かに含んでいる節を選択することは難しく、従って腫瘍特異養子免疫療法の源としてリンパ節リンパ球 (LNL) の有用性は制限される。

【0006】

【発明の概要】 概して、一つの局面に於て本発明は、例えば、Tヘルパー細胞若しくはTヘルパーリンパ球と呼ばれるCD4+腫瘍特異リンパ球などの腫瘍反応性細胞の豊富なリンパ節を確実に決定するための方法に関連したものである。本発明の方法は、新生組織、例えばガン等により生成される若しくはそれに関連したマーカーに特異的に結合する効果的な量の放射性標識されたロケータを患者へ投与する過程を含んでいる。その後かかる投与過程に続いて放射性標識されたロケータが任意の新生組織に於て優先的に集中し、結合されていない放射標識されたロケータが浄化され、患者に於て背景の光子放出に対する新生組織からの光子放出の比が増大するよう時間が経過される。かかる時間が経過した後、放射検出プローブを用いて、リンパ節の部位に於て放射線レベルが上昇していることを検出することにより放射標識されたロケータが付加していることを示すリンパ節部位を決定するべく患者が検査される。(例えば好ましくは外科的に行われる。但し、腹腔鏡を用いることは実用的ではないと考えられるが、かかる機器を用いることは本発明に於て除外されるものではない。) その後、かかる増大した放射線レベルを呈するリンパ節部位は除去され肉眼的な分析を受ける。かかる部位は、別の方法として或いは付加的に組織学的分析、例えばヘマトキシリン及びエロシン (H&E) 組織学的評価、を受けるようにしてもよい。

【0007】 かくして決定され除去されたリンパ節のうち肉眼的観察により腫瘍がないと判断されたもの若しくは肉眼的に転移性の疾患がないと判断されたリンパ節 (即ち視覚的には正常に見えるが抗体を取込んだリンパ節) は、腫瘍反応性細胞、例えば、その中に腫瘍特異Tリンパ球を増殖させるべく選択され培養される。かかるリンパ節の部位は組織学的分析を受けた際に、H&Eにより組織学的に陰性であると判断されたリンパ節部位が増加のために選択される。その後選択されたリンパ節は

分裂促進刺激を受ける。その後リンパ節は、例えばインターロイキン2 (IL-2)、抗CD₃ モノクローナル抗体及び追加的にオートローガス若しくは異型の腫瘍である新生組織の存在下で有利に培養される。その後増殖された腫瘍反応性細胞、例えばTリンパ球は、腫瘍の発達を軽減 (緩和) するべく養子免疫療法的方式に従って用いられる。増加された、即ち増殖された腫瘍反応性細胞、例えばTリンパ球、は、ガンの治療に於て有効な治療薬である。

【0008】 現在に於て、CD4+腫瘍特異リンパ球は、証明されてはいないが、本発明の治療薬により示されている治療作用に関連していると信じられている。除去されたリンパ節は、CD4+腫瘍特異リンパ球の内容によって、かかるリンパ球が腫瘍発達の軽減に重要であるかどうかによらず確実に特徴付けることができる。

「腫瘍反応性細胞」は、除去され増加されたリンパ節に於て含まれている活性 (腫瘍発達を軽減する上での活性) を有する細胞を述べるものとして選択された語である。かかる「活性を有する細胞」は、CD4+腫瘍特異リンパ球を含むと信じられるが、このことは本発明を制限するものではない。

【0009】 本発明の有利な点は、例えばCD4+腫瘍特異リンパ球などの腫瘍反応性細胞が確実に豊富な或るリンパ節を確実に選択することができるということを含む。更なる利点は、リンパ節を除去することにより患者から疾患した組織を除去できることである。本発明の更なる利点はin vivo に於ける腫瘍発達の軽減のための治療薬を形成するべくTリンパ球を含む腫瘍反応性細胞を容易に増加できるということである。これら及びその他の利点はここに含まれている開示事項に基いて当業者に容易に理解されるであろう。

【0010】

【実施例】 図面に於て報告された実験的結果は以下に於て議論される。

【0011】 最近まで、疾患した (例えば腫瘍に関連した) リンパ節をin vivo で選択することは外科医の視覚的な選択及び病理学者の診断に限られていた。ニアロダ等 (Nieroda et al., "Radioimmunoguided Surgery (RIGS) in Recurrent Colorectal Cancer", Cancer Detection and Prevention, Vol. 14, Issue 6, pages 651-656 (1990), 及び "Radioimmunoguided Surgery in Primary Colon Cancer", Cancer Detection and Prevention, Vol. 15, Issue 3, pages 225-229 (1991)) は、Neoprobe (登録商標) RIGS (登録商標) ガンマ検出プローブを用いた「Radioimmunoguided SurgeryTM」システムによって新生組織に苦しめられている患者の段階付けをするための方法を開示している。(Radioimmunoguided SurgeryTM はネオプローブコーポレーション (Neoprobe Corporation, Columbus, Ohio) の商標であり、Neoprobe (登録商標) 及びRIGS (登録商標) はネオプローブコーポレ

ーションの登録商標である。) かかるシステムにより決定された如きリンパ節の関連物によって外科医若しくは腫瘍学者は患者を適切に段階付けすることができ、例えば補助的な化学療法のために患者を更に詳しく段階付けすることができる。

【0012】かかる段階付けについての発展は米国特許第4,782,840号に基いており、同米国特許は、新生物の位置決めをし、新生物を識別し除去するための非常に改良された方法を開示する。かかる技術は、放射性標識された抗体と外科医が放射能が増大した部位を検出するために手術中に於て使用できる携帯用の放射線検出プローブとを用いている。かかる処理手順はRIGS(登録商標)システムとして知られており、腫瘍の検出は、血液中に流れる放射性標識された抗体の背景が患者の体から浄化され腫瘍によって放射される光子放出若しくは放射線が腫瘍の周囲の組織に比べて増大するようになった後で行われるべきであると認識することで成功裡に行われる。幸運なことに、米国特許第4,782,840号は、放射性標識された抗体がその放射性タグを結合した状態で長い期間新生組織に結合した状態もしくは関連した状態に残っていることができるということを*

表 1
リンパ節分類

| | |
|---------|--|
| タイプ 0 | RIGS [®] プローブ(-), 組織学的検査(-) |
| タイプ I | RIGS [®] プローブ(+), 組織学的検査(-) |
| タイプ II | RIGS [®] プローブ(+), オカルト腫瘍 |
| タイプ III | RIGS [®] プローブ(+), 通常の組織学的検査(+)(巨視的) |
| タイプ IV | RIGS [®] プローブ(-), 通常の組織学的検査(+)(巨視的) |

タイプ0 のリンパ節は、検出され得る放射能を持たず又腫瘍の組織学的証拠を有していない。タイプI のリンパ節は、放射能について陽性であるが通常のH&E組織学的検査によれば陰性である。タイプIIのリンパ節は、放射能について陽性でありオカルト腫瘍の証拠を含んでいる。タイプIII のリンパ節は、放射能について陽性であり腫瘍の組織学的証拠を含んでいる。タイプIVのリンパ節は、放射能について陰性であるが、腫瘍の証拠を含んでいる。

【0015】解剖学上、多くのタイプI のリンパ節は門部周辺のリンパ節、腹腔リンパ節及び脾臓上大動脈のリンパ節に見出される。一次結腸直腸ガンを有する患者に於て排出領域的結腸間膜リンパ節はタイプI である。タイプIII 及びタイプIVのリンパ節は、その大部分について腫瘍周辺の結腸間膜に見出される。タイプI のリンパ節が更に連続断面化若しくはサイトケラチン抗体により分析されると、タイプI のリンパ節の約40%は腫瘍の証拠を有しており、それらは実質的にタイプIIのリンパ節とされる。本発明の目的について、タイプI のリンパ節は、H&E組織学的検査により決定され、それらのリンパ節は腫瘍反応性細胞、例えばCD4+Tリンパ球を

* 開示する。更に、腫瘍部位に於て放射能の付加は時間と共に低減するが、血流及び周囲の組織の背景は腫瘍部位に比べて更に早い速度で低減し、従って、Neoprobe(登録商標) RIGS(登録商標) 1000放射線検出器の如き手で持てるプローブを用いることで放射性部位が容易に決定される。

【0013】Neoprobe(登録商標) RIGS(登録商標) 1000放射線検出器と¹²⁵I CC49モノクロナル抗体と共に米国特許第4,782,840号のRIGS

(登録商標) システムを用いて、リンパ節は、同定され5つの分類に分けられている。その後の成果により、そのような細かい分類は腫瘍発達の軽減のための治療薬のために増加され形成されるための適切なリンパ節を選択するためには必要はないことが明らかにされた。以下の議論の幾つかは、その元々のリンパ節の分類について述べるが、本発明を実施するに当たりかかる分類の使用は必要はないということは理解されるべきである。この初期の分類は以下の表1に示されている。

【0014】

【表1】

増殖するべく培養するために選択される。しかしながら、見かけのタイプI のリンパ節に於て、連続断面化若しくはサイトケラチン抗体による方法で検査され、組織学的方法によって陽性とされかくしてオカルト腫瘍を含んでいることの分ったリンパ節は、分類し直して実質的にタイプIIのリンパ節とするのが好ましい。かくして殆んど若しくは全く腫瘍を有していないLNLがCD4+腫瘍特異リンパ球を増殖するべく培養するのに用いられる。リンパ節の分類についての更なる議論は以下の文献に見られる(Arnold, et al., "Radioimmunoguided Surgery Challenges Traditional Decision Making in Patients with Primary Colorectal Cancer", Surgery, Vol. 112, No. 4, pp 624-630 (October 1992); 及びArnold, et al., "Intraoperative Detection of Colorectal Cancer with Radioimmunoguided Surgery and CC49, a Second-Generation Monoclonal Antibody", Annals of Surgery, Vol. 216, No. 6, pp 627-632 (December 1992))。

【0016】本発明の方法の第一の過程は、新生組織により生成された若しくはそれに関連したマーカーに特異的に結合する有効な量の放射性標識されたロケータを患者へ投与することを含む。上記の如く、「ロケータ」

は、新生組織若しくは新生物により生成された或いはそれに関連したマーカー（例えばガン細胞若しくはガン細胞の生成物）に結合することにより腫瘍の部位に優先的に集中する物質を含む。今日の適当なロケータは、基本的には抗体（全及びモノクローナル）、抗体のフラグメント、全抗体及び抗体フラグメントのキメラ型、及びそれらのヒト型化されたものを含む。しかしながら、一本鎖の抗体（米国特許第4,946,778号に開示されている如きSCA）及び同様の物質が開発されており、同様に有効であることを示すことができるということが理解されるであろう。生化学及び遺伝子工学により、

「抗体」の伝統的な定義に包含されないが新生組織の部位に選択的に集中する抗体の機能を真似る物質を生成することができる。「ロケータ」は、ここに開示する本発明の方法に於て抗体を模倣すると判断される物質と共に現在までの抗体及びそれに等価なものを含む語として選択された。

【0017】現在に於て、本発明に於て有用な抗体は、抗TAG抗体、例えばB72.3（抗TAG72抗体、(Dr. Jeffrey Schlom, National Cancer Institute)）、CC49（第二世代のB72.3抗体, Arnold, et al., "Intraoperative Detection of Colorectal Cancer with Radioimmunoguided Surgery" (RIGS (登録商標)) and cc49 a second-Generation Monoclonal Antibody (Mab)", Ann. Surg., 出版されるよう受け入れられた。; Cancer Res. 50, 6987-6994, Nov. 1, 1990; Cancer Res. 48, 4597-4603, Aug. 15, 1987; J. Clin. Lab. Analysis 3:369-369 (1989); Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1989, 370:21-26; Cancer Res. 50:4885-4890, Aug. 15, 1990; Cancer Res., 48:4588-4596, 1988; Cancer Res., 50:4872-4879, Aug. 15, 1990; Cancer 67:2880-2886, 1991; Cancer Res. 50:1291-1298, 1990; Biotechnology, 3:378-384, 1985; Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 78 : 3199-3203, Cancer Res., 48:6811-6818, 1988; Cancer Res., 48:2214-2220, 1988; J. Nat'l Canc. Inst. 1986:6666):995-1003; Int'l J. Cancer 1982:29:539-545; Int'l J. Cancer 1983:31:543-551; Cancer Res., 50:6987-6994, 1990; Cancer Res., 51:2889-2896, 1991; J. Clin. Lab. Anal., 4:465-473, 1990; Cancer Res., 51, 6363, 6371, Dec. 1, 1991; J. Nat'l Cancer Inst. 82:1191-1197, 1990; Cancer Res. 51, 5378-5383, Oct. 1, 1991); を参照。)、CC83（もう一つの第二世代のB72.3抗TAG抗体）、CEA抗体、例えばA₅B₇モノクローナル抗体（Cancer Research Campaign Technology, Ltd, London, England）（Int. J. Cancer, 47:597-602, 1991; Br. J. Cancer, 54:75-82, 1986; Br. J. Cancer, 61:891-894, 1990; Int. J. Cancer, Supplement 3, 34-37, 1988; Eur. J. Nucl. Med., 13:197-202, 1987; Br. J. Cancer, 60:594-554, 1989; and Br. J. Cancer, 61:659-662, 1990; を参照）、モノクローナル抗体B17-1A及びそのF(ab')₂フラグメント（Winster Institute, Philadelphia, Pa.）、そしてモ

ノクローナル抗体19-9とそのF(ab')₂フラグメント（Centocor, Inc., Philadelphia, Pa.）などを含む。

【0018】放射性標識の選択について、リンパ節の直ぐ近くに配置され得る放射性検出プローブを用いることができるためには、低エネルギーレベルの同位体が好ましく、特にそれらの同位体の光子放出のエネルギーレベルは、約550keV以下であり、約300keV以下が有利であり、好ましくは150keVである。¹²⁵Iが現在使われている選択された同位体であるが、米国特許第4,782,840号に開示されている如く更なる低エネルギーの同位体が必要であれば、或いは望ましい場合若しくは便宜上用いることができる。高エネルギーレベルの放射性同位体（例えば¹³¹I）もまた用いることができるが、放射線検出プローブの適当なコリネーションが採用されなければならない、このことは、装置が外科医にとって容易に用いることができるということが妨げられ、適当に検査されるべき体腔内に於ける領域が制限されるということである。

【0019】ガンマ放射線を発する放射性同位体の他に、ベータ放射線を呈する放射性同位体も更にベータ放射線若しくはポジトロンを検出することのできるプローブと共に用いることができる。手術中に於てベータ放射線を検出することが例えば米国特許第5,008,546号に於て開示されている。

【0020】放射性標識されたロケータの投与量は、かかる放射性標識されたロケータの付加を呈するリンパ節部位を決定するのに放射線検出プローブが使用可能となる量である。かかる投与量は、標識の仕様形式、ロケータの形式及び当業者に明らかな投与の要件に影響し得る因子に依存している。

【0021】放射性標識されたロケータの付加を示すリンパ節の部位の検出に関して、米国特許第4,801,803号、同第4,889,991号及び同第5,070,878号に於てガンマ放射線の検出の好ましい手で保持できるプローブが示されている。上記の如く米国特許第5,008,546号は、ベータ放射線の検出に適当なプローブを開示する。更なる放射線検出装置が必要に応じて、所望の場合若しくは便宜上用いることができる。この点に関して、リンパ節関連物を決定するために手術中に於て患者の検査を行うということは本発明の実施についての一つの例に過ぎない。更に、プローブは、腹腔鏡、縦隔鏡、若しくは放射能の付加を決定するためにリンパ節のすぐ近くに配置することができるよう最小化された放射線検出装置に適当に装備することのできる同様の特別の装置の一部として用いられてよい。採用される装置若しくは技術に拘らず、本願発明は、標識が如何なるものであっても、全てのこれらの装置及び技術を含む。

【0022】米国特許第4,782,840号に於て報告されている如く、放射線検出プローブを用いて患者を

直ぐ検査することは賢明ではない。好ましくは、放射性標識されたロケータの投与の後、結合していない放射性標識されたロケータが検査されるべきリンパ節の周囲の組織から浄化されるまでの時間が経過される。適当な放射線検出プローブは、血液流の背景（血液流中を循環する放射性標識されたロケータ）及び循環する結合していない放射性標識されたロケータを含み得る周囲の組織と共に患者が検査される場所（例えば手術室）に於て見出される通常の背景放射能を越える放射能レベルを決定することにより機能する。かかる時間は、患者の体が放射性標識されたロケータをどの程度の早さで浄化（若しくは代謝）するかにより依存して数分間程度から数週間に亘る。重要なことは、放射性標識されたロケータが、かかる時間経過した後に、低減されたレベルではあるが放射性標識がそのままの状態では腫瘍細胞の部位に結合されているということを認識することである。外部シンチグラフィ及び外部画像技術に於て伝統的に教示される如く放射性標識されたロケータの取込みが腫瘍に於て最大であるということに基いてリンパ節を調べることは適当ではないということは重要である。

【0023】適当な時間が経過された後、患者は放射線検出プローブをもって検査され、リンパ節の部位がそこに於ける放射線のレベルが上昇されたことをそのプローブで検出することにより放射性標識されたロケータの付加が決定されるようプローブで調べられる。米国特許第4,782,840号に開示されている如く外科的处理の順序を変更し得る微小転移性組織を決定する他に、本願発明によれば、外科医は、新生組織（ガン）の後退のための治療薬を調製するのに使われるCD4+リンパ球の豊富なリンパ節を決定することが可能となる。

【0024】その後、決定されたリンパ球細胞は、従来の免疫療法の手順に於ける慣用の細胞増加とは大きく逸脱した態様にて増加若しくは増殖される。簡単に述べれば、細胞増加は、リンパ節組織からのLNLの分離の過程と、ex vivo に於ける細胞増加の活性化及び開始、培養液の交換、細胞培養の分割及び外因性サイトカインからの分離及び細胞の採取と患者へ投与するための最終生成物の調製の過程を含む。

【0025】細胞及び組織の分離は、慣用的に、例えば遠心等によってLNLを採取するために行われる。細胞増加の開始は、この細胞増加の方法に独特な血清のないマクロファージSFM培養液を初めに用いることを含む。更に、分裂促進刺激が最も好ましくは、IL-2及び溶解性の抗CD₃セルを用いて行われる。IL-2及び抗CD₃セルは、（従来の如く連続的に加えること及びプレートに結合された抗CD₃セルを用いるのではなく、）同時に加えられる。成長の過程に於て培養には、新鮮な培養液及びサイトカインが周期的に加えられる。重要なことには、細胞は、IL-2の量を低減するべく、即ち20セタス（Cetus）単位/mlまで低減するべ

く新鮮な培養液のみ取込むことによって外因性のサイトカイン（例えばIL-2）から離れる。細胞を外因性のサイトカインから離すことによって、LNL細胞と共に患者へ更なるサイトカインの投与をする必要がなくなると信じられる。そしてデータはこのことを確認することとなる。

【0026】典型的な細胞増加の方法の詳細は以下の通りである。

【0027】第0日

ex vivo に於ける細胞成長のための培養液は、50 µg / ml のゲンタマイシンを含む無血清マクロファージSFM培養液が予め梱包された10L培養液分注バックを用いて無菌状態で調製される。細胞及び組織分離処理からの洗浄されたリンパ節リンパ球を含む円錐形チューブが静かに数回に亘り反転され細胞を混合する。細胞は混合され、1 ml 量が計数のために取出される。細胞の濃度に基いて、IL-2及び抗CD₃が細胞の懸濁液へ加えられる。その量は、加えられた培養液に於てIL-2（キロン・コーポレーション（Chiron Corp., Emeryville, CA））が100 Cetus 単位 / 10⁶ 細胞の濃度となるように、抗CD₃（OKT3、ジョンソン・アンド・ジョンソン（Johnson and Johnson, Raritan, NJ））が100 ng / 10⁶ 細胞の濃度となるような量である。

【0028】IL-2及びOKT3を含む細胞懸濁液は、60 ccの無菌シリンジを用いて完成した培養液を含む1 L無菌気体透過性培養バッグへ移される。従って最終的な細胞濃度は、1 × 10⁶ 細胞/mlである。細胞は、ここで閉じた培養系内に含まれ、10日間の培養期間の終りまで閉じた系にあることとなる。

【0029】細胞培養バッグは、患者の同定のための印がラベルされ、7% CO₂を含む37℃の湿潤されたインキュベータ中に置かれる。

【0030】第4日

インキュベーション期間の開始4日後に於て、細胞培養バッグは、インキュベータから取出される。バッグは静かに揉まれ、細胞を溶液中に分散する。無菌シリンジが培養バッグのサンプリングポートに差込まれ、5 mlの量が計数、生存率及び形態学的分析のために取出される。

【0031】新鮮な1 Lの培養バッグの各々へ加えられるべき新鮮な完成培養液と細胞懸濁液との最終的な体積は、バッグ当たりの最終濃度が0.25 × 10⁶ 細胞/mlとなることを基本にして計算される。10⁶ 細胞毎に300セタス単位の濃度のIL-2が細胞懸濁液を含む培養バッグへ加えられ、従って、最終的なIL-2の濃度は各々の新鮮な1 L培養バッグに於て100 Cetus 単位となる。

【0032】細胞培養バッグは、ここで新鮮な培養液及び新鮮な無菌の気体透過性培養バッグへ移送されるべく準備される。デュポン（DuPont）SCD無菌チュービングウェルダを用いて、閉じた移送線が無菌ポンプチュ

ープ機構、細胞懸濁液を含む培養バッグ、新鮮な完成培養液のバッグ及び培養液及び細胞が移送されることとなる無菌バッグの間に形成される。ポンプチューブは、蠕動ポンプのカムに挟まれ、懸濁液と加えられる新鮮な完成培養液の体積が設定される。ポンプが始動され、細胞懸濁液のバッグの内容物と新鮮な培養液が予め定められた数の新鮮な培養バッグへ分配される。

【0033】移送が完了すると、無菌チューブシールが各々のバッグに溶接される。バッグは患者の同定の印がラベルされる。全てのバッグは、37℃、7%CO₂の湿潤されたインキュベータへ戻される。全ての元の培養バッグは医療廃棄物についての産業上の指示に基づいて廃棄される。

【0034】第7日

培養期間の開始から7日後、静かに揉まれることにより細胞は再び混合される。5ml量が培養バッグのうちの一つから取出され、細胞の数、生存率及び形態について分析される。細胞の数に基づいて、新しい培養液と細胞懸濁液の体積が、新鮮な1L培養バッグに於ける最終的な濃度が 0.5×10^6 細胞/mlになるよう計算される。40セタス単位/10⁶細胞のIL-2が新鮮な完成培養液へ加えられ、培養液及び細胞懸濁液が移送されることとなる培養バッグの各々に於けるIL-2の最終的な濃度が20セタス単位/mlとされる。

【0035】前記の如く蠕動ポンプと無菌チューブウェルダの機構を用いて新鮮な気体透過性バッグへ細胞と新鮮な培養液が移送される。移送とシールが完了すると、バッグはラベルされ、37℃、7%CO₂の湿潤されたインキュベータに置かれる。

【0036】第9日

患者への注入のための細胞の調製の24時間前に、10%のバッグから10mlの量が、好氣的及び嫌氣的微生物学的分析のために取出される。

患者への注入のための調製

第10日

培養期間の10日目に於て、培養バッグは、培養バッグの各々から培養液を取除き、細胞をプールし、細胞を濃縮するためにインキュベータから取出される。バッグの数によって、この処理は、45分から2時間かかることとなろう。各々の1L培養バッグはステリセル (Stericell) 処理器及び収集ボールを用いて250ml/分の速度にて処理される。バッグのチューブは処理器のカムに挟まれ、ポンプと遠心が始動される。細胞は処理器のボールに集められ、残りの培養液は引出されて廃棄される。

【0037】全ての培養バッグがプールされ培養液が除去された後に、約950mlの1.25%USPヒトアルブミンの無菌塩溶液が細胞に通され、残留する培養液を除去する。ステリセルポンプの流れは逆転され、約270mlの細胞が無菌500ml移送バックへ汲み入れられ

る。処理器ボールは50mlのアルブミン及び塩水溶液の混合物を用いて移送バックへ注がれる。この輸液調製物の最終的な細胞の濃度は、 $1-5 \times 10^{10}$ 細胞となる。この調製物には適当な患者の同定のラベルが成される。

【0038】品質管理 (QC) 検査のために輸液バッグから無菌シリンジを用いて1ml量が取出される。その後全てのQC検査が完了するまで輸液バッグは2-8℃に保存される。QC検査から満足のいく結果が報告された後、かかる患者の輸液調製物は主治医へ送られる。

【0039】製造行程の管理

全QC過程

品質管理過程は、製造に用いられる物質及び最終生成物の品質の双方を確実にするために構成されている。

【0040】付加的な管理は、製造行程全体に亙り患者の細胞の同定を保証することを含んでいる。或る患者についての全ての細胞培養容器はその他の患者の細胞から隔離されており、特定の患者同定の印をもってはっきりとラベルされている。各々の患者は、10日間のインキュベーション期間の間、彼等の細胞がその他の患者のものと混ざらないよう各個人の細胞に提供されたインキュベータに割当てられている。

【0041】開放した状態で細胞培養を操作することは最小化されており、初めの培養開始の過程に於て、要求されれば、かかる開放系に於ける細胞培養処理操作は薄いフローフード中に於て無菌状態で実行される。細胞培養の分割及び移送を含む処理の多くは汚染を防ぐべく閉じた培養系内にて行われる。

【0042】細胞培養QC検査

第0日、第4日、第7日及び第10日に於て、細胞培養の試料が無菌的に収集され、生存率、細胞数、及び形態について分析される。生存率及び細胞数は、青色染色技術を用いて調べられる。形態は、ライトーギムザ染色法を用いてサイトスピン試料を顕微的に観察することにより実行される。

【0043】患者への注入の24時間前に、好気性細菌及び嫌気性細菌培養がBACTec血液培養試薬を用いて実行される。患者への注入の直前に於て、グラム染色が実行され、FDAが権利を有する市販の試験を用いてエンドトキシン検査が行われる。

【0044】増加され活性化された細胞の輸液調製物はグラム染色について陰性であり細胞生存率 $\geq 70\%$ を示し、測定されたLALレベルが $< 1.0 \text{ EU/ml}$ でなければならない。

【0045】望ましくは、約 10^{10} 細胞が患者に投与するために生成される。オートローガスの増加された細胞が、リンパ節が除去された患者へ投与する際に用いるのに好まれる。また、好ましくは外科医により切除可能と判断された新生組織は前記の如く決定されたリンパ節と共に除去される。治療薬の投与は、その後に行われる。関連物が切除できない患者については、決定されたリン

バ節のみが除去され、増加され、かくして生成された治療薬が投与される。

【0046】ここに報告される初期のデータは以下の実験の手順に基いて得られた。

【0047】例1

初期の実験の手順

患者の選択とRIGS（登録商標）プローブ装置

患者の選択及びRIGS（登録商標）プローブ装置に適切な患者は、結腸直腸ガンであって再発性疾患若しくは一次ガンの何れかを有する患者とされた。本研究に於て対象となった全ての患者は、それらの患者から腹部外の腫瘍について除去できるかどうかを詳しく手術前に評価された。手術前の評価は胸部、腹部、骨盤のCTスキャンを含み、必要と見做されれば骨の走査を行うことも含む。CEA検査及び結腸鏡もまた術前評価の一部である。全ての患者は学会検査委員記載の同意書（Institutional Review Board Written Consent）に署名した。放射性標識された抗体の投与の2日前に患者はヨウ化カリウムの経口溶液による処置を開始し（1日に2回10滴のSSKI、若しくは1日に2回の500mgのKI）、放射性標識されたCC49モノクローナル抗体の甲状腺による取込みを防ぎ、この療法を3週間若しくは手術まで続けた。CC49 MoAb はオハイオ州立大学（OSU）メディカルセンターに於ける核薬剤部でヨードゲン（Iodogen）法を用いて放射性ヨウ素化された。標識されていない抗体をもってネガティブ皮膚検査が実行されると、患者は静脈注射により4mlのリン酸により緩衝された塩溶液に薄められた1mCiのヨウ素¹²⁵Iにて標識された0.1mgのCC40 MoAbを受取り5分間に亘り注入された。全ての患者は注射後1時間に亘り15分毎に生命徴候を記録することにより観察された。患者は、ガンマ検出プローブ（GDP）、Neoprobe（登録商標）RIGS（登録商標）1000装置により決定される胸部の計数が2秒当たり20カウント以下になったとき手術をするよう予定された。血清試料が手術に於ける注射の前に得られた。

（¹²⁵I）にて標識された0.1mgのCC40 MoAbを受取り5分間に亘り注入された。全ての患者は注射後1時間に亘り15分毎に生命徴候を記録することにより観察された。患者は、ガンマ検出プローブ（GDP）、Neoprobe（登録商標）RIGS（登録商標）1000装置により決定される胸部の計数が2秒当たり20カウント以下になったとき手術をするよう予定された。血清試料が手術に於ける注射の前に得られた。

【0048】手術中の手順は、Neoprobe（登録商標）RIGS（登録商標）1000装置を用いた開腹術に関連している。その詳細は以前に記載されている。外科的手術の時点に於て肝胃間膜、胸部領域、腹腔節、脾臓上領域及び腸肝膜節に於けるリンパ節が探查され、RIGS（登録商標）プローブが陽性であるリンパ節が見出された。RIGS（登録商標）プローブが陽性である組織は背景に対する組織の比が1.5:1以上であることにより決定される。種々のリンパ節が腫瘍組織の試料と共に患者から採取された、これらの物質は緩衝塩溶液中に於て迅速に病理学部門へ送られた。全ての物質は病理学者により検査された。組織は無菌的に処置された。

【0049】用いられた全てのリンパ節は、長手方向に二分され、半分はリンパ節研究所へ送られ、通常のヘマ

トキシリン及びエオシン（H&E）組織学的評価のために保存された。病理学者は、全ての切断された節を調べた。腫瘍組織は病理学者により調べられ、数センチ以下の小さな断片が取出され無菌塩溶液中に置かれ、リンパ節研究所へ送られた。ヘマトキシリン及びエオシン染色法を含む通常の病理学検査が全ての患者の物質について行われた。

【0050】リンパ球の調製

手術の日に於て、患者から血液が採られフィコールハイパーク（Ficoll-Hypaque）（ファルマシア（Pharmacia））分離が実行され、末梢血単核細胞（PBMC）が得られた。これらの細胞はRPMI 1640に於て洗浄され再懸濁された。RPMI 1640には、ペニシリン（100単位/ml）、ストレプトマイシン（100ug/ml）、及びAB型の10%のヒト血清（GIBCO、マイコプラズマ検査された）が加えられた。これは完全なRPMI（RPMIc）である。脾細胞が用いられる場合、脾臓組織は穏やかに細分化されてRPMIcへ入れられた。かくして生成された細胞懸濁液は上記のフィコールハイパーク分離により処理された。これらのリンパ球が刺激因子細胞として用いられる場合、それらは混合されたリンパ球培養に添加される前に4000rads（セシウム源）に曝された。

【0051】リンパ節は処理されるまで無菌媒体内に於て氷上にて保存され、節を穏やかに細分化してRPMIcに入れることにより調製された。細胞懸濁液は遠心分離され、ペレットがRPMIcに於て洗浄された。生存率が各々の測定の前に青色排除法により決定された。生存率は通常95%以上であった。CD4+及びCD8+リンパ球についての測定は、クールター（Coulter）からのエピックスエリート（Epics ELITE）フローサイトメーターを用いて行われた。LNLは二重染色試薬T4-FITC/T8-PE（Olympus）を用いて染色された。細胞（ 5×10^5 /チューブ）は、0.1ml PBS（1%ウシ胎児血清）中に再懸濁され、室温にて遮光して10ulのT4/T8染色試薬中にて20分間インキュベートされた。それらは更にPBSにて二度洗浄され、0.5mlのPBSで緩衝された1%ホルマリンによって固定され、フローサイトメーターを用いて分析するまで4℃にて遮光して保存された。

【0052】腫瘍試料の調製

切除された腫瘍は生存率を維持するべ無菌塩溶液中にて氷上で保存された。病理学的検査に必要な組織を除去した後、腫瘍は血清を含まないRPMI（RPMIc）にて洗浄され、ペトリ皿に置かれ、そこに於て1~1.5mmの寸法の断片に分割された。分割された腫瘍は50mlの円筒形の遠心チューブへ移送され、そこに於て組織は更にRPMIcにて洗われた。5ml~10mlを除いて全ての媒体が除去され、PBS中に調製された同じ体積の0.4%タイプ1コラゲナーゼ（シグマ（SIGMA）

A) がチューブへ加えられた。この消化作用は、37℃にて1時間インキュベートして可能となった。チューブは細胞の分散を補助するべく15分おきに振盪された。インキュベーションの後、RPMIc が45mlに等しくなるよう加えられた。消化されなかった腫瘍は沈められ、細胞懸濁液がチューブの上部から注意深く除去された。細胞は15分間400gにて遠心された。残りの腫瘍はチューブ内に残され、その後更なる消化を行った。腫瘍細胞のペレットが2倍のRPMIc 中にて洗浄された後、生存率が青色排除法により決定された。腫瘍細胞が増殖測定に用いられる場合、それらは添加される前に3000rads (セシウム源) に曝された。残りの生腫瘍懸濁液は将来の実験に於て異型の細胞として用いるべく凍結腫瘍バンクとして保存された。

【0053】腫瘍細胞系統

腫瘍細胞は、アール (Earle) 塩を用いた最小の必須培養液にて成長された。培養液にはL-グルタミン2mM、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム0.1mM、MEMビタミン溶液及び15%ウシ胎児血清 (全てGIBCOからのもの) が加えられた。Glico はヒトグリオー
20 ム腫瘍系統である。CAR-1は肝移植を受けた患者から得られた転移性カルシノイドについてのカルシノイド腫瘍であり、結腸ガン細胞と同じ過程を用いて処理された。WD124 (結腸ガン腫細胞系統) は、RIGS (登録商標) 処理過程に於て再発性の結腸ガンを有する患者から単離された。これらの継代された細胞系統が混合されたリンパ球/腫瘍の測定に於て用いられる場合、それらは添加に先立って3000rads (セシウム源) に曝された。

【0054】混合された腫瘍リンパ球の測定

IL-2は20u/mlの濃度にて用いられた。抗CD₃はマウス型の抗ヒト抗体である。(Yoshizawa, et al, "Activation of Anti-CD₃ of Tumor-Draining Lymph Node

Cells for Specific Adoptive Immunotherapy", Cellular Immunology, 134, 473-479, 1991 を参照。) 混合された腫瘍リンパ球培養の実験は96の円形の底部を有する組織培養ウェルプレートに於て実行された。RPMIc が、ウェル当たりの最終的な体積が0.2mlとなるよう試薬及び細胞の希釈剤として分析全体に互り用いられた。全てのグループについて対照実験が行われており、それらは、抗CD₃ 投与による応答と共に、IL-2を伴ったリンパ球若しくは腫瘍細胞だけのもの、リンパ球と腫瘍細胞を両方含むもの、IL-2の混合された培養の場合からなる。リンパ球はウェル当たり 1×10^4 の密度にて、腫瘍細胞はウェル当たり 5×10^3 の密度にて添加された。プレートは湿潤されたCO₂ インキュベータ (5% CO₂) 中にて37℃で96時間インキュベートされた。この期間の後ウェル当たり1uCiの [³H] チミジン (ICN、特異的活性、6.7Ci/mm³ ol) が18時間加えられた。細胞採取器 (PHD) がガラスファイバーフィルタストリップと共に用いられ、ウェルが採取された。孔の開けられたフィルタディスクがバイアルへ落され、水性のシンチレーション混合溶液がベックマン1801シンチレーションカウンタにて計数される前に加えられた。ステューデントのt テストを用いた統計的分析が有意性を決定するべく行われた。

【0055】初期の実験結果

タイプI LNLがIL-2及び抗CD₃ の存在下に於てオートローガス (照射された) 腫瘍と共に混合された腫瘍リンパ球培養に於て培養されると、図1及び表2に於けるデータを参照して理解される如く [³H] チミジンの取込みにより測定される如きリンパ球の増殖が3倍～
30 10倍に増大する。

【0056】

【表2】

表 2

| グラフ内 番号 | 培養形式 | Anti-CD ₃ (ng/ml) | 毎分当りの カウント |
|------------|---|---------------------------------|---------------|
| 10 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 977 |
| 10 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 2414 |
| 10 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 3217 |
| 10 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 2675 |
| 12 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 1827 |
| 12 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 8051 |
| 12 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 9412 |
| 12 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 8920 |
| 14 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 1843 |
| 14 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 5802 |
| 14 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 5803 |
| 14 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 5789 |
| 16 | Auto PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 996 |
| 16 | Auto PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 1937 |
| 16 | Auto PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 3201 |
| 16 | Auto PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 3270 |
| 18 | Allo PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 1317 |
| 18 | Allo PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 2324 |
| 18 | Allo PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 2665 |
| 18 | Allo PBLs + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 3729 |

増殖は、リンパ球が抗CD₃と低濃度のIL-2 (20 U/ml) にて活性化された場合のみ生じる。これらのLNLは前記のデータが示す如く種々の程度にて異型のヒト結腸ガン細胞に反応する。LNLはIL-2のみ存在する場合に腫瘍細胞に対して僅かながら増殖する。そしてしばしばIL-2及び抗CD₃と共に見られる増殖に比較してIL-2及び腫瘍細胞のみの場合に有意な増殖*

*は見ることはできない。

【0057】図2及び表3のデータに示されている如く、IL-2の濃度を非常に高くしても(100若しくは500 U/ml)、増殖は刺激されず、低濃度のIL-2と抗CD₃の場合も同様である。

【0058】

【表3】

| グラフ内 番号 | 培養形式 | IL-2 (U/ml) | Anti-CD ₃ (ng/ml) | 毎分当りの カウント |
|------------|--|----------------|---------------------------------|---------------|
| 20 | LNL + IL-2 | 20 | 0 | 558 |
| 22 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 20 | 50 | 1793 |
| 24 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 20 | 50 | 5398 |
| 26 | Auto + LNL + IL-2 | 20 | 0 | 1070 |
| 28 | Auto + LNL + IL-2 | 100 | 0 | 986 |
| 30 | Auto + LNL + IL-2 | 500 | 0 | 277 |

タイプIのリンパ節は、約40%~70%のCD4+リンパ球と約8%~15%のCD8+リンパ球を含む。PBLによってIL-2及び抗CD₃がCD4+及びCD8+リンパ球の増殖を刺激することができIL-2のみではCD4+リンパ球の増殖を刺激しないということが示されている(Nishimura, et al., "Generation, Propagation, and Targeting of Human CD4+ Helper/Killer T-cells Induced by Anti-CD₃ Monoclonal Antibody Plus Recombinant IL-2. An Efficient Strategy for Adoptive Tumor Immunotherapy.", J. Immunol., 148:285-29

1, 1992.)。タイプIのリンパ節に於けるCD4+リンパ球の高いパーセンテージから抗CD₃及びIL-2はこれらの細胞を刺激し、IL-2のみではこれらの細胞を刺激できないということがある得る。

【0059】図3及び表4から理解される如く、タイプIのリンパ節に比べて、タイプIIILNLは、オートローガス腫瘍、異型の腫瘍若しくはIL-2及び抗CD₃の組合せに应答して増殖しない。

【0060】

【表4】

表 4

| グラフ内 番号 | 培養形式 | Anti-CD ₃ (ng/ml) | 毎分当りの カウント |
|------------|--|---------------------------------|---------------|
| 32 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 192 |
| 32 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 310.8 |
| 32 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 308.6 |
| 32 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 311 |
| 34 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 270.9 |
| 34 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 279.5 |
| 34 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 246.7 |
| 34 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 286.7 |
| 36 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 439.7 |
| 36 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 382.4 |
| 36 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 470.5 |
| 36 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 446.3 |

増殖に関する限り、かかる腫瘍免疫活性が欠如していることについての理由は、腫瘍含有節がTIL細胞の源であるので明確ではない。(Schwartzentruber, et al., "Specific Release of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Gamma Interferon by Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes After Autologous Stimulations," J. Immunol., 146:3674-3681, 1991)。しかしながら、TIL細胞の成長についての測定は長期間の培養及び高濃度のIL-2 *

*を必要とし、ここに報告されているLNLの測定は新鮮な培養に於ける短期間、即ち4日間の分析である。

【0061】図4及び表5から理解される如くタイプ0のリンパ節のリンパ球はその応答が変化しており、殆んどがIL-2及び抗CD₃の存在下で異型的若しくはオートローガス腫瘍に対して殆んど腫瘍特異的増殖を示さない。

【0062】

【表5】

表 5

| グラフ内 番号 | 培養形式 | Anti-CD ₃ (ng/ml) | 毎分当りの カウント |
|------------|--|---------------------------------|---------------|
| 38 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 359.1 |
| 38 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 421 |
| 38 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 406 |
| 38 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 376.2 |
| 40 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 327.6 |
| 40 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 357.2 |
| 40 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 321 |
| 40 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 321.5 |
| 42 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 1 | 476.7 |
| 42 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 10 | 491.1 |
| 42 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 50 | 563.4 |
| 42 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 100 | 504.8 |

選択されたタイプ0の節のうち約25%~30%のみが、タイプIの節の>90%の有意な増殖に比較して腫瘍に対し有意に増殖する。腫瘍特異的増殖を呈するタイプIの節を有する患者から得られたタイプ0の節が存在した。しかしながら細胞に於て見られる増殖量は、常

※に、図5及び表6に示されている如く、タイプIのリンパ節に於て見られるものより遥かに小さい。

【0063】

【表6】

表 6

| グラフ内 番号 | 培養形式 | リンパ節分類 | 毎分当りの カウント |
|------------|--|--------|---------------|
| 44 | LNL + IL-2 | 0 | 364 |
| 46 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 0 | 345 |
| 48 | LNL + Auto + IL-2 + Anti-CD ₃ | 0 | 2398 |
| 50 | LNL + IL-2 | I | 912 |
| 52 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 3217 |
| 54 | LNL + Auto + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 9412 |

これらの結果は、腫瘍特異活性についてリンパ節を選択するということについて本発明が有用であるということを示唆する。

【0064】図6A及び図6Bと表7に於て見られる如く、脾臓リンパ球は、LNLについて見られるものと同*

表 7

| グラフ内 番号 | 培養形式 | 脾臓分類 | CD ₃ (ng/ml) | 毎分当りの カウント |
|------------|--|------|----------------------------|---------------|
| 56 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 1 | 425 |
| 56 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 10 | 990 |
| 56 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 50 | 1285 |
| 56 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 100 | 1831 |
| 58 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 1 | 426 |
| 58 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 10 | 1396 |
| 58 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 50 | 1598 |
| 58 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 100 | 2122 |
| 60 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 1 | 1504 |
| 60 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 10 | 3744 |
| 60 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 50 | 5278 |
| 60 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | I | 100 | 4387 |
| 62 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 1 | 215.6 |
| 62 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 10 | 412.3 |
| 62 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 50 | 435.5 |
| 62 | LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 100 | 405.5 |
| 64 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 1 | 197 |
| 64 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 10 | 341 |
| 64 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 50 | 343 |
| 64 | Auto + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 100 | 385 |
| 66 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 1 | 526.7 |
| 66 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 10 | 502.2 |
| 66 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 50 | 1012 |
| 66 | Allo + LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | III | 100 | 1145.22 |

殆どどの脾臓は腫瘍細胞の存在に矛盾しないプローブの放射能を呈する。しかしながら、殆ど脾臓は除去されないで現在のところ脾臓リンパ球に於けるデータは殆どない。

【0066】タイプI のリンパ節からのLNLは、オートローガス及び異型的腫瘍に应答して増殖する。図7及び表8を参照して理解される如く、これらのLNLは異型的結腸ガンの供与者と同じ供与者からの異型的PBLに対して増殖せず、また、それらはオートローガスPBL (図1参照)、ヒトグリオーマ細胞、若しくはヒトカルシノイド腫瘍細胞に対して増殖しない。

【0067】

【表8】

* 様の応答を有する。即ちタイプI の脾臓リンパ球は結腸腫瘍に应答して増殖し、タイプIII の脾臓リンパ球は増殖しない。

【0065】

【表7】

| グラフ内 番号 | 腫瘍型 | 毎分当りの カウント |
|------------|-------|---------------|
| 70 | 無 | 1239 |
| 72 | Auto | 7496 |
| 74 | Glio | 2340 |
| 76 | WD124 | 2208 |
| 78 | CAR1 | 2036 |
| 80 | PBL | 2002 |

最近の研究により、IL-2及び抗CD₃の組合せがIL-2のみではできないCD4+末梢血リンパ球の増殖を刺激し得ることが示されている (Nishimura, et al., "Generation, Propagation, and Targeting of Human CD4 + Helper/Killer T-cells Induced by Anti-CD₃ Monoclonal Antibody Plus Recombinant IL-2", supra.)。タイプI のLNLは50%以上CD4+リンパ球を含み、抗CD₃及びIL-2を使用することによりCD8+リンパ球と共にCD4+のリンパ球の増殖が刺激される。かくしてCD4+及びCD8+リンパ球の分離及び成長因子及び腫瘍に対する増殖応答が望まれる。

50 【0068】以下の例3に報告される治療手順に関連し

て、本発明により決定されたリンパ節の表現型分析が、
フローサイトメトリック分析を用いてIL-2 (20u
/ml) 及び抗CD₃ 中の培養がなされる前及び後のリン*

*パ球について行われ、以下の結果が記録された。

【0069】

【表9】

表 9

| 患者/節型 | 1日 | | 12-16日 | |
|----------------------|------|-------|--------|-------|
| SMC8-046 リンパ節 | CD4 | 63.2% | CD4 | 68.3% |
| | CD8 | 19% | CD8 | 35.4% |
| | CD3 | 79% | CD3 | 82.1% |
| | CD19 | 11.3% | CD19 | 4.4% |
| RG154 リンパ節 | CD4 | 51% | CD4 | 62.3% |
| | CD8 | 6% | CD8 | 29.4% |
| | CD3 | 61.7% | CD3 | 97.7% |
| | CD19 | <1% | CD19 | <1% |
| JG192 腸間膜 リンパ節 | CD4 | 67.3% | CD4 | 43.5% |
| | CD8 | 8.9% | CD8 | 41.6% |
| | CD3 | 84.8% | CD3 | 96.9% |
| | CD19 | 3% | CD19 | <1% |
| JG196 門周辺 リンパ節 | CD4 | 61.4% | CD4 | 36.2% |
| | CD8 | 8.3% | CD8 | 45.8% |
| | CD3 | 79.6% | CD3 | 96.3% |
| | CD19 | 3.9% | CD19 | <1% |

これらの結果は、培養後T細胞 (CD₃) 集団が増殖していることを示している。また、これらの結果はCD19細胞 (B細胞) が培養中に於て低減していくことを示している。その他の研究に於て抗クラスI 主要組織適応性抗体 (MHC) を加えることにより、LNL増殖が阻害され、抗クラスIIMHC抗体も同様であった、ということ、注意されるべきことである。

【0070】種々の分裂促進刺激条件下に於てリンパ節リンパ球を長期間培養することが行われ、そこでの増加が前記のデータの多くに於て報告された如き抗CD₃ を 30
使用した場合に比較された。培養は 1×10^6 LNL/
ml RPMIc (25m HEPES緩衝剤、100単位

/ml ペニシリン、0.1mg/ml ストレプトマイシン、及び10% 硬化され熱により不活性化されたヒトプラズマが補足されたRPMIc) にて第一日を開始された。四日後、細胞は1ml当たり 0.25×10^6 に分割され、その後この態様にて継代が続けられた。以下のものが添加された。IL-2 20単位/ml、抗CD₃ 50ng/ml、ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA) 2ng/ml、イオノマイシン 50ng/ml。添加物と細胞増加とは、表10に示されている。

【0071】

【表10】

表 10

| 患者 日数 | IL-2 + Anti-CD ₃ 増大倍数 | IL-2 + PMA + イノシン酸 増大倍数 |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| JK196P 門周辺リンパ節 | | |
| 5 | 1 | 1.7 |
| 7 | 4 | 10.2 |
| 11 | 15 | 82 |
| 15 | 16.2 | 114.8 |
| KM098 門周辺リンパ節 | | |
| 4 | 1 | 1 |
| 6 | 1.6 | 6 |
| 8 | 2.9 | 36 |
| 11 | 12 | 130 |
| 13 | 20.6 | 223.6 |

更なる特徴付けは、単独で培養された患者 J G 1 9 6 の 20* ので比較することに関連している。以下の結果が記録さ
LNL 試料による腫瘍壊死因子 (TNF) アルファの分 図 8 に示されている。
泌をそのみで培養された場合とオートローガス腫瘍、 【0072】
異型的腫瘍若しくは抗 CD₃ と共に培養された場合のも* 【表 11】

表 11

| 患者 JG 196 | TNF α (pg/ml/10 ⁶ LNL) | |
|-----------------------------------|---|------------------------------------|
| | IL-2 + Anti-CD ₃ 培養細胞 (番号 82) | IL-2 + PMA + イノシン酸 培養細胞 (番号 84) |
| LNL のみ | <15 | <15 |
| LNL + オートローガス腫瘍 | 428 | 305 |
| LNL + 異型的腫瘍 | 75 | 75 |
| LNL + IL-2 + Anti-CD ₃ | 80 | 45 |

これらの結果は、LNL 細胞がオートローガス腫瘍の存在下でサイトカインを生成することを示す。更に、増殖された LNL 細胞がオートローガス腫瘍に反応してサイトカインを生成し、このことはこれらが腫瘍反応性リンパ球であることを支持する。

【0073】例 2

後期の実験的手順

本発明を発展する過程に於て後期に実行された成果は、40 前記の過程をやや改良することを含む。患者の選択及び手術は実質的に初期の実験的過程について述べられたことと同一である。再度、切除され細胞増加に用いられるリンパ節の決定は巨視的な腫瘍の証拠 (視覚及び触診による) がない放射性標識された抗体の存在を検出することに関連する。このデータは以下に基本的に報告された。Trionzi, et al., Cancer, Vol. 73, No. 3, February 1, 1994。

【0074】細胞の調製

診断のために必要でないリンパ節及び腫瘍の試料は病理 50

学者によって切除された試料から得られた。各々のリンパ節の半分は組織病理学的検査のために用いられ、その他の半分は免疫学的研究のために用いられた。組織の分離は薄いフローフードに於て無菌状態で実行された。組織は遠心チューブ内にて RPMI、抗生物質、抗真菌性物質により濯がれ、氷上のペトリ皿へ移送された。外部の組織が外科用メスをもって切除され、組織が約 2-3 mm の直径の断片に細分化された。細胞は 5 ml シリンジの先の円い端部で穏やかに分解することにより分けられ、その後ハンクスの緩衝塩溶液で二回洗浄された。細胞の生存率は青色排除試験によって測定され、全ての分離物について 80% 以上であった。末梢血リンパ球がフィコールハイパークを用いた通常の勾配遠心技術を用いて患者からのヘパリン処理された末梢血より分離された。全ての直ぐに必要なとされない細胞は 5% のオートローガス血清と共にジメチルスルフォキシド中に冷凍保存された。

【0075】蛍光活性化細胞セルソーター分析

0. 1mlの培養液中にて 10^6 の細胞が0. 5mgのMo Abをもって4℃にて1時間処理された。2回の洗浄の後、1/40希釈にて二次蛍光性ヤギ抗マウスIg G (ベクトン・ディッキンソン (Becton Dickinson, Mountain View, CA)) が製造者の推奨に従って加えられた。細胞は1時間標識され、2回洗浄された後サイトフルオログラフを用いたフローサイトメーターによって解析された。以下のMo Ab が用いられた。pan T細胞 (Leu 4、抗CD3)、細胞溶解性/サブプレッサーT細胞 (Leu 2a、抗CD8)、ヘルパー/インデューサーT細胞 (Leu 19、及び抗CD56) (全てベクトン・ディッキンソンからのもの。)
「ナイーブ(naive)」T細胞 (2H4、抗CD45RA) 及び「メモリ(memory)」T細胞 (UCHL1、抗CD45RO) (どちらもAMAC (Westbrook, ME) からのもの) 及び抗HLA-DR (HB103、ATCC (Rockville, MD))。

【0076】細胞溶解活性

腫瘍細胞は、 $100\mu\text{Ci} / 5 \times 10^6$ 細胞/0. 5mlのクロム酸 (^{51}Cr) ナトリウムで37℃にて1時間標識された。腫瘍細胞 ($10^4 / 100\mu\text{l}$) は、三重の6mmの円形の底部を有するプレートへ付加された。ナチュラルキラー抵抗性ダウジ (Daudi) 細胞標的が、測定の陽性対照実験として用いられた。上記の如く生成されたエフェクタ細胞がエフェクタ対標的比が40:1、20:1、5:1、1. 5:1となるよう同一の培養液 ($100\mu\text{l}$) に加えられた。また、トライトンX-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を加えた標識化された標的細胞のみを含む3つの最大放出ウェルと3つの自発的放出ウェルが含まれている。プレートは遠心され (200g、5分間)、37℃にて4時間インキュベートされた。プレートは再度遠心され $100\mu\text{l}$ の上澄みが除去された。溶解のパーセンテージは、以下の式により決定された。(実験の毎分当たりのカウント [cpm] - 自発的cpm) / (全cpm - 自発的cpm) 各々の変数は三重に検査された。

【0077】増殖測定

増殖測定は、IL-2が存在する場合及び存在しない場合に於てBSM (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) と照射されたオートローガス及び異型の腫瘍細胞と共に、及び照射されたオートローガス正常結腸細胞と共に 10^5 のリンパ球をインキュベートすることにより実行された。96時間培養した後、細胞は $1\text{mCi} [^3\text{H}]$ チミジンにて37℃で1時間パルス標識され、セル採取器を用いて採取された。取込まれた放射能はシンチレーション計数法により測定された。

【0078】統計的解析

対になった及び対になっていないステューデントのtテスト及びマンローホイットニー (Mann-Whitney) Uテストがリンパ球集団の表現型及び機能的特性に於ける違いの有意性を決定するために用いられた。回帰モデルを用い

た分散解析が増加率の違いを分析するべく用いられた。

【0079】結果

リンパ節

組織は、例1の調査に於て調査した再発性或いは結腸直腸ガンを有する20の患者 (8人の女性及び12人の男性) からのものが調べられた。これらの患者に於て、平均年齢は57歳であった (33~72歳)。視診及び触診上正常に見られたが ^{125}I 標識されたCC49を含んでいる1~11の (平均4) のリンパ節がプローブによって同定された。しばしばこれらのリンパ節は非常に高い放射能レベル (リンパ節対背景カウントが10:1以上) を示し、しばしば、それらは、伝統的に肝胃間、腹腔及び腸骨領域の如き結腸ガン種についての腫瘍排出部位として考えられていなかった部位に於て同定されることがあった。25の放射性標識されたMo Abを含む臨床的に正常なリンパ節と放射性標識されたMo Abを含んでいなかった6個の臨床的に正常なリンパ節 (5人の異なる患者からの) が免疫学的調査のために切除された。

【0080】リンパ節に於ける腫瘍の存在は、通常組織学的評価、即ちヘマトキシリン及びエオシン (H&E) 染色とMo Ab AE1-3 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) を用いた免疫組織化学的方法で評価され、サイトケラチンを同定した。改良されたアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体技術 (Vectastain, Vector, Burlingame, CA) がマウスMo Abを同定するのに用いられた。通常、プローブにより位置決めされたリンパ節に於て腫瘍細胞のうち一つ若しくは二つの患部のみが通常H&E染色法に於て見出された。腫瘍細胞が同定されない場合、免疫組織化学的調査では、CC49が胚中心にて特徴的な三日月型若しくは円形の樹枝状パターンに分配されるということが示された。また、腫瘍細胞の存在は、分離及び勾配遠心法 (フィコール-ハイパック、ファルマシア) の後、リンパ節から調製された細胞遠心調製物を染色することにより調査された。

【0081】放射標識されたMo Abを含む25の臨床的に正常なリンパ節は、「微視的腫瘍」若しくは「放出された抗原 (shed antigen)」の何れかを含むとして分類された。17個の試料は、微視的腫瘍を含んでいると分類された。腫瘍細胞は17の全てに於てリンパ節を分離し勾配遠心した後に見出された。これらのリンパ節のうちの14に於て病理検査に供された半分についてのH&E染色法に於て腫瘍が見出された。腫瘍細胞は8個のリンパ節に於て分離により同定されず、またH&E染色法に於ても同定されなかった。これらは放出された抗原を含んでいるとして分類された。放射性標識されたMo Abを含んでいなかった6つの臨床的に正常なリンパ節に於て分離によってもH&E染色法によっても同定されなかった。

【0082】表現型

プローブにより同定されたリンパ節からのリンパ球の表現型がその他のリンパ球集団(表12)と比較された。6つの異なるリンパ球集団が調べられた。(1)微視的腫瘍を有するリンパ節、(2)放出された抗原を有するリンパ節、(3)巨視的腫瘍を有するリンパ節、(4)非関連のリンパ節、(5)TIL、及び(6)末梢血リンパ球(PBL)。フローサイトメーターによる検査が新しく単離された物質の表現型についての特徴を決定するべく実行された。TILは、分離及びリンパ球の収率を改善するべく1000U/ml IL-2と共に培養されたものに於ける24時間後に表現型が調べられた。

【0083】微視的腫瘍若しくは放出された抗原を有す*

*リンパ節からのCD4-CD8比は、その他のリンパ球集団の何れよりも大きかった($P < 0.05$)。プローブによって同定されたリンパ節及び巨視的腫瘍を有するリンパ節は、TIL、PBL、及び非関連のリンパ節よりも非常に多くのCD45RO⁺細胞を有していた($P < 0.05$)。PBLはその他の集団の何れのもの及びTILよりも非常に多くのCD56⁺細胞を多く有していた($P < 0.001$)。微視的腫瘍を有するリンパ節と放出された抗原を有するリンパ節との間に表現型に於ける違いは検出されなかった。

【0084】

【表12】

表 12
リンパ球集団の表現型*

| | 微視的腫瘍 (n=12) | 放出された抗原 (n=8) | 巨視的腫瘍 (n=6) | 非関連 (n=6) | 腫瘍リンパ球 (TIL) (n=4) | 末梢血リンパ球 (PBL) (n=9) |
|---------|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|
| CD3 | 73±10 | 71±15 | 64±16 | 72±20 | 72±16 | 62±13 |
| CD4 | 63±11 | 59±12 | 44±15 | 50±12 | 35±6 | 41±18 |
| CD8 | 10±3 | 10±4 | 19±7 | 21±11 | 24±18 | 22±4 |
| CD4/CD8 | 6.3±0.9 ^{ab} | 5.9±1 ^{ab} | 2.3±0.8 | 2.4±0.4 | 1.5±0.5 | 1.9±0.3 |
| CD56 | 4±3 | 4±3 | 1±1 | 1±1 | 1±1 | 14±5 ^{ac} |
| CD45RA | 16±8 | 17±10 | 12±10 | 33±14 ^d | 18±9 | 20±14 |
| CD45RO | 40±13 ^{ac} | 38±16 ^{ac} | 37±16 ^{ac} | 20±9 | 21±12 | 29±19 |
| HLA-DR | 31±15 | 28±6 | 27±13 | 21±15 | 24±11 | 20±15 |

*リンパ節からのリンパ球はフローサイトメーターを用いて分析された。得られたデータは陽性細胞の平均のパーセンテージ標準偏差で示されている。

^a 有意な差異。

^b 巨視的、非関連、TIL、PBLに対して $P < 0.001$ 。

^c 微視的、放出された抗原、巨視的、非関連、TIL、PBLに対して $P < 0.001$ 。

^d 微視的、放出された抗原、巨視的、TIL、PBLに対して $P < 0.001$ 。

^e TIL、PBL、非関連に対して $P < 0.001$ 。

増加

1000U/mlのヒト組換えIL-2(recombinant human, Cetus, Emeryville, CA)に应答する種々のリンパ球集団の増加も調べられた。全ての培養は10⁶細胞/ml

にて開始され全体に拡がった際に分割された(3-6日毎)。微視的腫瘍を有するリンパ節及び放出された抗原を有するリンパ節からのリンパ球の増加は同程度で、双方ともTIL、巨視的腫瘍を有するリンパ節、及び非関

連のリンパ節のものよりも非常に大きかった ($P < 0.05$)。非関連のリンパ節からのリンパ球の増加は巨視的な腫瘍を有するリンパ節及びTILよりも非常に大きかった ($P < 0.05$)。TILの集団は通常、CD4+及びCD8+の組合せ若しくはCD8+の集団が優位である状態に発展した。全てのリンパ節リンパ球の集団はCD4+の集団が優位である状態でCD4+及びCD8+の組合せに発展した。CD8+細胞が現れることは、培養の増加の低減及びTIL培養の増加の増大に関連しているように見られた。

【0085】増殖

Neoprobe (登録商標) 1000プローブによって同定されたリンパ節からのリンパ節リンパ球の増殖応答と (同一の患者からの) 非関連のリンパ節リンパ球についてのものとを比較した。リンパ球 (10^5 / ウェル) が照射された (5000R) オートローガス及び異型の腫瘍細胞 (0-50, 000 / ウェル) と共に10U/mlのIL-2がある場合及びない場合について5日間培養された。また、リンパ球は、或る範囲の濃度の、溶解性のTAG-72の源としてCC49結合エピトープを表現するBSMに曝された。 [3 H] チミジンが採取の18時間前に加えられた。オートローガス腫瘍 (50, 000細胞) は、プローブにより同定された全てのリンパ節 (16の異なる患者からのN=19のリンパ節) に於て、IL-2が存在する場合及び存在しない場合の双方に於て有意な増殖を誘導した。(刺激されていない細胞の三つの標準偏差よりも大きな [3 H] チミジンの取込みが見られた。) オートローガス正常結腸細胞及びPBLは何れの調査に於ても増殖を誘導しなかった。IL-2が存在する場合及び存在しない場合の双方に於てオートローガス及び異型的TAG-72+結腸直腸腫瘍試料に対する微視的腫瘍を有するリンパ節からのリンパ球の増殖応答は、非関連のリンパ節からのリンパ球のものよ

りも大きかった ($P < 0.01$)。非関連のリンパ節からのリンパ球に比べて、微視的腫瘍に曝されたリンパ節からのリンパ球は投与に対する応答の態様に於てBSMに応答して増殖した。増殖応答に於けるCC49の可能な役割とその結合エピトープの可能な役割を特徴付けするべく微視的腫瘍に曝されたリンパ節からのリンパ節リンパ球が添加物を何等加えない場合及びBSM (100 μ g / ml)、CC49 (0.1 μ g / ml) 及びBSMとCC49とを加えたものの存在下に於て10U/mlのIL-2中にて4日間培養された。CC49のみでは増殖を増大しなかった。BSMとCC49の組合せはBSMのみによって誘導された増殖を抑えることはなかった。

【0086】プローブによって同定されたリンパ節からのリンパ球の増殖応答が、TAG-72⁺ 腫瘍細胞とTAG-72⁻ 腫瘍細胞とに対するそれらの増殖応答を比較することによって更に調べられた。以下の細胞が評価された。腹膜偽性粘液腫を有する患者からの強いTAG-72⁺ の細胞を含む患者由来のオートローガス及び異型的TAG-72⁺ (即ちCC49⁺) 結腸ガン細胞、患者由来のTAG-72⁺ 乳ガン、患者由来のTAG-72⁻ 扁平細胞肛門直腸ガン、TAG-72⁻ 黒色腫、及びTAG-72⁻ 結腸直腸ガン、TAGリンパ芽球ダウジ細胞、LS174T細胞(ATCC)、結腸ガン腫細胞系統であつてin vivo にてTAG-72を表現しin viro にて表現しないもの。微視的腫瘍を有するリンパ節からのリンパ球は全てのTAG-72⁺ 腫瘍に対して増殖した。微視的腫瘍を有するリンパ節の患者由来のTAG⁺ 腫瘍細胞に対する増殖はTAG-72⁻ 細胞に対するものよりも大きかった ($p = 0.0001$)。これらの結果は表13に示されている。

【0087】

【表13】

表 13

腫瘍細胞に対する増殖応答*

| | マイトジェンなし | IL-2 |
|---------------------|-------------|---------------|
| 腫瘍のない細胞 | 444 ± 185 | 5476 ± 1800 |
| TAG-72+ 腫瘍細胞 | | |
| オートローガス結腸 | 1428 ± 600 | 10,495 ± 1435 |
| 異型的結腸 | 1755 ± 531 | 9313 ± 1764 |
| ムチン結腸** | 5203 ± 1866 | 13,376 ± 2719 |
| 乳 | 2571 ± 1519 | 10,302 ± 3277 |
| Tag-72- 腫瘍細胞 | | |
| 結腸 | 884 ± 625 | 7621 ± 1319 |
| 直腸 | 584 ± 268 | 7410 ± 152 |
| Daudi | 712 ± 217 | 8066 ± 3173 |
| LS174T | 124 ± 86 | 798 ± 282 |

* プローブで同定されたリンパ節からのリンパ球は、50,000個の照射された腫瘍細胞と共に或いは、それらとU/ml単位のIL-2と共に4日間刺激された。データは、4つの異なる患者からのリンパ節について、CPMの平均増殖 ± 標準偏差で表わされている。リンパ球のTAG-72+腫瘍についての増殖TAG-72 腫瘍 についての増殖の差は、マイトジェンが存在する場合及びしない場合に於いてP=0.0001で有意であった。

** ムチン結腸：腹膜粘液腫を有する患者からの強いTAG-72+の細胞。

培養されたLS174T細胞は増殖応答を抑制した。このことは、かかる形質転換された細胞系統に於て腫瘍由来の抑制因子が存在する可能性を示唆する。標的として凍結されたLS174T細胞を用いた場合抑制は誘導されなかった。

【0088】細胞溶解活性

これらの実験に於ては、PBLの集団と共に分離されたリンパ節及び腫瘍が、IL-2が1000U/mlにて、35日間までの間に於て培養された。全ての培養は10³⁰細胞/mlにて開始され全面増加の際に分割された。増加されたリンパ球の細胞溶解活性は、4-7日間の培養の後のもの及び21-28日間の培養のものについて標準的な4時間の⁵¹Cr放出分析によって評価された。予め凍結されたオートローガス腫瘍、異型の腫瘍及びナチュラルキラー抵抗性ダウジ細胞が標的として用いられた。TAG-72を表現する二人の患者の一方から由来する腫瘍細胞が全ての異型的測定に於て用いられた。これら二つの患者からの細胞は健康な供与者から生成されたリンホカイン活性キラー試薬に対して等しく感受性を示した(±10%)。これらのデータは表14に示されている。

【0089】

【表14】

表 14
リンパ球集団の細胞溶解活性

| 日数 | 微視的腫瘍 (n=7) | 放出された 抗原 (n=6) | 巨視的腫瘍 (n=7) | 非関連 (n=6) | 腫瘍リンパ球 (TIL) (n=4) | 末梢血 リンパ球 (PBL) (n=7) |
|---------|----------------|----------------------------|----------------------------|--------------|--------------------------|-------------------------------|
| オートローガス | 4-7 21-28 | 21±8 ^{bc} 2±2 | 18±6 ^{bc} 5±3 | 9±5 2±1 | 4±4 6±4 | 39±18 ^{bd} 6±4 |
| 異型的 | 4-7 21-28 | 24±8 ^{bc} 3±4 | 19±6 ^{bc} 4±3 | 8±5 3±2 | 3±4 4±2 | 51±28 ^{bd} 5±4 |
| Daudi | 4-7 21-28 | 34±14 ^{bc} 4±6 | 38±11 ^{bc} 3±3 | 10±7 2±3 | 4±2 5±3 | 73±21 ^{bd} 3±2 |

a: リンパ節からのリンパ球は、1000U/mlのIL-2と共に培養された。細胞溶解活性が、患者由来のオートローガス及び異型のTAG-72及びTAG-72のナチュラキラー細胞に対して決定された。細胞溶解活性は、培養の4日～7日後及び21日～28日後に決定された。データは、エフスケッチ対照的比40:1に於ける溶解の平均±標準偏差で表されている。

b: 有意な差異。

c: 巨視的、非関連、及びTILに対してP<0.05。

d: 微視的、放出された抗原に対してP<0.001。巨視的、非関連、TILに対してP<0.0001。

最も高いレベルの細胞溶解活性はPBLから生成された。微視的腫瘍を有するリンパ節の細胞溶解活性及び放出された抗原を有するリンパ節の細胞溶解活性は類似した。PBLから生成された細胞溶解活性よりも低いこれらのリンパ節からの細胞溶解活性は、TILから生成されたもの、巨視的に関連のあるリンパ節及び非関連のリンパ節から生成された細胞溶解活性よりも一致して大きかった(P<0.05)。オートローガス腫瘍を特異的に殺すことはどの時点でも観察されなかった。全ての培養に於て細胞溶解活性は時間と共に低減した。

【0090】考察

in vivo に於て腫瘍反応性リンパ球を位置決めすることができる技術が発展された。放射性標識されたMoAb及びガンマ検出プローブを用いて微視的腫瘍を若しくは放出された抗原を有するリンパ節を同定することによってin vivo に於て再現性よくオートローガス腫瘍に対し

て反応性を有するリンパ節リンパ球を位置決めすることができる。リンパ節はその腫瘍に対する応答性が変化する。それらは、結腸直腸ガンに於ける転移の初めの部位であり、宿主-腫瘍相互作用に於て重要な役割を演ずる。リンパ節に転移する結腸直腸ガンを有する多くの患者は関連する排出リンパ節を含む単純な外科的处理過程によって長期間の生存を達成する。ここに於ける結果は、結腸直腸ガン腫を有する患者のリンパ節に於てはたとえ一次腫瘍から離れたリンパ節に於ても微視的腫瘍に対する免疫応答が存在することを支持する。我々の結果は、巨視的腫瘍に関連したリンパ球及びTILの免疫学的応答性が乏しいということを確認するものである。微視的腫瘍及び放出された抗原を有するリンパ節からのリンパ球に比較して巨視的腫瘍を有するリンパ節、TIL、及び非関連のリンパ節からのリンパ球は機能的に低減されているように見える。細胞溶解活性、増殖応答及び増加を含む機能についての幾つかの研究に於て違いは明らかである。

【0091】観察された免疫学的応答に対するマウスMoAbの寄与は未知である。リンパ節の免疫組織学的構成はin vivo に於て放射性標識されたMoAbを用いて再発性又は転移性疾患を有する患者に於ける腹腔全体に互り位置決めされ、これはMariani-Costantiniの免疫組織学的研究に於て報告されたものに類似している(Mariani-Costantini, et al., "Immunohistochemical Evidence of Immune Response to Tumor-Associated Antigens in Lymph Nodes of Colon Carcinoma Patients", Cancer, 1991;67:2880-66.)。これらの研究者は、(ex vivo に於て)CC49を含むTAG-72に対する種々のMoAb及びリンパ球と単球/マクロファージ抗原決定基に対する種々のMoAbを一次結腸直腸ガンを有する患者からの非関連の所属リンパ節部分へ適用した。また彼等は胚中心に於ける免疫病理化学的反応を記載し、放出されたTAG-72エピトープが選択的に認識され胚中心のB細胞に対して示されるということを結論した。

【0092】in vivo に於けるMoAbを受取っていない患者からのリンパ節の免疫病理組織化学的研究に加えてその他の観察により、MoAb CC49が組織学的応答の中心ではないということが示唆される。MoAb CC49のみではプローブによって同定されたリンパ節リンパ球のin vitro に於ける増殖を刺激しない。オートローガス腫瘍に対して反応するリンパ節リンパ球は、ヒト抗マウス型MoAb抗体が検出された患者に於て及びヒト抗マウス型MoAb抗体が検出されていない患者に於てかかる技術を用いて同定された。更に、巨視的腫瘍を有するリンパ節及びTILがMoAbを含むという事実と共にリンパ節の各々の位置は、観察された免疫学的変化が抗マウスMoAb応答に対する単なる二次的なものであるという可能性について反論するものである。

【0093】プローブによって同定されたリンパ節は、

CD4:CD8比の増大により特徴づけられる。CD4⁺細胞の増加は炎症性応答に於ける重要な初期現象である。結腸直腸ガンを有する患者を含むガンを有する患者のリンパ球表現型は詳しく研究されている。種々の研究グループからの結果は一致していない。現在の結果を含む殆どの研究によれば、TILのCD4:CD8比はPBLに於て及び非関連のリンパ節に於て通常見られる2:1比よりも遥かに低いことが見出されている。また、その他の研究者によれば、結腸直腸ガンを有する患者のリンパ節に於てCD4⁺細胞が増大することが観察されている。アダチ等は、結腸直腸ガンを有する患者のリンパ節に於けるCD4⁺細胞がかなり増大していることを報告した。アダチ等は、中間的な節（即ち動脈幹の節）及び胆のうヒステル形成処理からの節と比較して腫瘍のない結腸周囲節に於てCD4⁺細胞がかなり増大していることを報告した。(Adachi, et al., "Immune Competent Cells of Regional Lymph Nodes in Colorectal Cancer Patients: I. Flow Cytometric Analysis of Lymphocyte Subpopulation" J. Surg. Oncol., 1991;46:110-6.)。

【0094】プローブにより同定されたリンパ節は、矛盾なくTAG-72⁺腫瘍細胞及び溶解性のムチンに対する増殖応答を示し、前の感作を示唆する。TAG-72⁺腫瘍に対する増殖応答は、TAG-72⁺に対するものよりも低い、増殖応答の特異性及びTAG-72/腫瘍関連ムチンが重要であるかどうかは確立されていない。炭化水素エピトープに結合するCC49 MoAbを増殖測定に於て添加しても応答は抑制されなかった。

【0095】オートローガス腫瘍が何れかのリンパ球集団によって優先的に殺されるということは観察されなかった。ダウジ細胞、異型の腫瘍及びオートローガス腫瘍に対する細胞溶解活性は、全ての調査に於て平行的に生じた。すぐ見出されたことは、用いられたIL-2の濃度(1000 U/ml)についての結果である。IL-2と共に培養された殆どのTILは、主要組織適合性による制限された細胞毒性を示さず非特異的な細胞毒性を示す。ムチンを認識する細胞毒性T細胞は、主要組織適合性ではない制限された態様にて細胞を殺す。ムチンの複数の抗体価を持った性質は、複数のT細胞の受容体が効果的に同時に係合することを見越しており、かくして抗原-レセプタ複合体が主要組織適合性により制限された安定化をする必要がなくなると仮定されている。細胞毒性及び増殖の研究による結果は、非主要組織適合性的に制限された相互作用に一致する。プローブによって同定させたリンパ節の細胞溶解活性は、その他のリンパ節よりも大きい、PBLのものより小さかった。リンパ球細胞毒性についての以前の研究の結果は相違している。幾つかの研究は、関連の及び非関連のリンパ節リンパ球及びTILの非特異的な細胞溶解活性はPBLのものよ

り低いということが結論されている。その他は、リンパ節及びTILから生成される非特異的な細胞溶解は、対応するPBLのものに匹敵するか若しくはそれ以上であると報告されている。

【0096】微視的腫瘍を有するリンパ節と放出された抗原を有するリンパ節との間に於てリンパ球の表現型及び機能に違いは検出されなかった。結腸直腸ガンを有する患者に於ける局所的なリンパ節は、正常な障壁が腫瘍に誘導されて壊されている結果として種々の細菌的及び化学的抗体によって影響されるので、結腸直腸ガンの局所的なリンパ節に於て見られる免疫学的変化が、腫瘍による結果なのか或いはその他の腸に由来する二次的な刺激の結果なのかどうかについてはしばしば不明瞭である。一次腫瘍から離れた及び結腸そのものから離れたリンパ節に於て免疫学的変化が見られるという事実は、かかる応答が腫瘍に対するものであり二次的な腸に由来する刺激ではないということが示唆される。

【0097】例3 更なる実験的過程

患者の手術、リンパ節の検出及び切除は上記の報告された態様にて実行された。分析によって以下のことが更に後の実験により見出された。

【0098】細胞培養

リンパ球懸濁液は、10%の熱により非活性化されたヒトプラズマ、ペニシリン及びL-グルタミン (GIBCO, Grand Island, NY) を含むRPMI 1640に於て初めの密度を 10^6 細胞/mlとして 7.5cm^2 の組織培養フラスコ (Falcon Co.) 内で種々の条件下でインキュベートされた。培養は湿潤された組織培養インキュベータ (Forma Scientific) を用いて 37°C にて5.0% CO_2 中で無菌状態下で行われた。細胞培養は、新鮮な培養液を調製された培養液へ加えることにより、4日目に於て密度が 2.5×10^5 細胞/mlとなるように分割され、7日目に於て密度が 5.0×10^6 となるよう分割された。細胞数は、クーラーカウンタ (Coulter Counter) により決定され、生存率は青色排除法によって決定された。培養は、以下の生物学的応答修正剤を用いて行われた。IL-1 (Immunex, Seattle WA)、IL-2 (Cetus Corp., Emeryville, CA)、IL-4 (Amgen, Thousand Oaks, CA) インターフェロン- γ (IFN- γ) ガンマ (Biogen, Cambridge, MA)、OKT3抗-CD3抗体 (Ortho, Raritan, NJ)、インドメタシン、及びシメチジン。

【0099】表現型分析

リンパ球の表現型はモノクローナル抗体及びFACSを用いて決定された。新鮮なLNL及び培養されたリンパ球が、96個のV字形状のウェルプレート (Linbro Co.) へ10% FCS (FACS媒体) を含む $50\mu\text{l}$ のハンクスの平衡塩類溶液中で 10^6 細胞になるよう置かれた。細胞は、 4°C にて $20\mu\text{l}$ 中に $0.2\mu\text{g}$ のマウ

スモノクローナル抗体（ベクトン・ディッキンソン）と共に1時間インキュベートされた。マイクロプレートは600rpmにて遠心され、ペレットが振盪され150 μ l FACS媒体で3回洗浄された。細胞ペレットは振盪され0.2 μ gのフルオレセインの結合したヤギ抗マウスモノクローナル抗体（ベクトン・ディッキンソン）と共に約4℃にして1時間再懸濁された。FITC染色された細胞は遠心され、FACS媒体中で3回洗浄され、1%のフォルマリンを有する0.5ml FACS媒体中に再懸濁され、分析に用いるまで4℃にて保存された。用いられた抗体は、エピトープCD₃（T-細胞レセプタ）、CD₄（T-ヘルパ/インデューサー）、CD₈（T-細胞毒性サブプレッサ）、CD₂₈（Tac/IL-2レセプタ）、CD45RA（ナイーブ）、CD45RO（メモリー）、CD56（NK/LAK）、CD19（B細胞）CD14（単球/マクロファージ）及びフローレセインが結合されたヤギ抗マウスIgG。

【0100】リンパ球の細胞毒性

培養されたリンパ球の細胞毒性は、標準の4時間の⁵¹Cr放出分析を用いて評価された。オートローガス結腸ガンの腫瘍細胞標的とNK-抵抗性ダウジ細胞系統とが37℃にて1時間100 μ Ci/5 \times 10⁶細胞/0.5mlにてクロム酸（⁵¹Cr）ナトリウムと共にインキュベートされた。細胞毒性測定は、100 μ l/ウェルにて10⁴の腫瘍標的を有する96のウェルマイクロプレートに於て行われた。エフェクタ細胞が100 μ lに於てエフェクタ：標的（E：T）比が1.5：1、5：1、20：1及び40：1となるように加えられた。トライトンX-100が完全な放出のために標識された腫瘍標的に加えられた。完全な放出及び自発的な放出の試料の双方は、各々の分析に於て対照実験として行われた。プレートは、37℃にて採取される前4時間5%CO₂に於てインキュベートされた。インキュベーション期間が完了した時点で細胞を含まない10 μ lの上澄みが注意深く吸引され計数された。細胞毒性のパーセンテージは、次の公式によって計算された。（実験のcpm - 自発的cpm）/（全cpm - 自発的cpm）。

【0101】リンパ球増殖測定

リンパ球の増殖応答は、³H-チミジン取込みによって測定された。リンパ球は、0.2mlの完成培養液中に於て10⁵細胞/ウェルにて96のウェルマイクロプレートにて培養された。オートローガス腫瘍がコラゲナーゼにて消化され、洗浄され、3000rad（セシウム源）にて照射され、反応子：刺激子比が2：1となる状態でリンパ球と共に、インキュベートされた。リンパ球は、96時間インキュベートされ、12時間の間1.0 μ Ci/ウェルの³H-チミジン（ニューイングランド・ニュークリア（New England Nuclear））をもってパルス標識された。プレートは、スカトロン（Skatron P h.D.）（Cambridge Technology）によってナイロ

ンフィルタ上に採取され、ベックマン6500ガンマカウンタでシンチレーション溶液中にて計数された。

【0102】IL-2生成分析

増加前及び増加後のリンパ球のIL-2の生成は、IL-2依存のCTL細胞を用いて測定された。端的に述べれば、1 \times 10⁵リンパ球が生物学的応答修正剤と共に、一晚、96のウェルマイクロプレートに於てインキュベートされた後、10 μ lの上澄みが各々のウェルから吸引され、別のプレートへ移された。CTL細胞が2 \times 10³細胞/ウェルの密度にてプレートへ加えられ、6時間後に1 μ Ci/ウェルの³H-チミジンにてパルス標識された。プレートは12時間の時点で採取され、前記の如く計数された。IL-2の標準の濃度に対するCTLの³H-チミジンの取込みのcpmが陽性の対照実験として行われた。

【0103】サイトカイン mRNA分析

サイトカインmRNAが、モルガン等によって記載されている如く（Morgan, et al., "Detection of Cytokine mRNA in vivo by PCR: Problems and Solutions", Transplantation, 56;2:437(1993).）複製連鎖反応（PCR）を用いて逆転写及び増幅により分析された。全RNAは、グアニジンイソチオシアネート溶液（4M グアニジンイソチオシアネート、2.5mMクエン酸ナトリウム pH7.0、0.5%サルコシル（sarkosyl）ナトリウム、0.7% β -メルカプトエタノール）中にて均質化され、5.7M CsCl クッション上にて超遠心することにより抽出された。cDNAは、5 μ g RNAからオリゴ（dT）プライマと、200U MMLV逆転写酵素を用いて調製された。試料は、無菌水にて最終的な体積が150 μ lとなるようPCRのために希釈された。PCR増幅は、パーキナー・エルマ（Perkin-Elmer）若しくはサーモラインテンプロニックサーマルサイクラー（Thermolyne Temptronic thermal cycler）に於て通常の技術を用いて実行された。cDNA（5 μ l）は、10mM Tris-Cl、pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.4 μ Mプライマ及び1.25U Taqポリメラーゼを含む50 μ lの反応液中にて増幅された。サイクルのパラメータは、94℃ 1分間、50℃～60℃ 2分間、72℃ 1分間、40サイクル。PCR生成物は2%アガロースゲルに於ける電気泳動及びエチジウムブロマイド染色によって解析された。IL-2、IL-4、IL-5、腫瘍壊死因子（TNF）- β 、 β -アクトチン及びインターフェロン（IFN- γ ）についてのPCRプライマは、ブレンナ等（Brenner, et al. "Message Amplification Phenotyping: A Technique to Simultaneously Measure Multiple mRNAs from Small Numbers of Cells", Biotechniques, 7:1096(1989)）を基に、オリゴス（Oligos, Etc. (Wilsonville, OR)）によって合成された。

【0104】統計的分析

分散分析 (ANOVA) が処理されたグループに於ける増殖及びIL-2生成分析に於ける違いを比較するべく用いられた。ノンパラメトリック分析が増加率を評価するために用いられた。

【0105】結果

増加

米国特許第4, 782, 840号に従って手術を受けた*

表 15

RIGSで位置決めされたリンパ節の増加率

LNLは、 1×10^6 細胞/mlで培養され、最大に増殖されるべく、4日目及び10日目で分割された。データは、リンパ節リンパ球の増加率(増加倍数)の平均±標準偏差で表わされている。IL-2/抗CD₃と共にRIGSで位置決めされたLNLを培養すると、IL-2のみの場合、及びIL-1/IL-2の場合に比して、非常に高い増加倍数が得られた ($p < 0.00001$)。

| | 6日 | 10日 | 14日 | 21日 |
|---------------------------|------------|------------|------------|-----------|
| IL-2 1000 U | 0.94 ± 0.2 | 2.52 ± 0.8 | 7.84 ± 3.8 | 32.5 ± 12 |
| IL-1/IL-2 | 1.27 ± 0.3 | 3.6 ± 1.0 | 13.6 ± 8.2 | 41.3 ± 18 |
| IL-2/anti-CD ₃ | 2.88 ± 1.8 | 36.0 ± 13 | 88.6 ± 21 | 173 ± 115 |

RIGSで位置決めされたLNLは、IL-2 100 U/ml及びIL-1 200 U/ml+IL-2 100 U/mlを含む培養に於て約40倍の増加を示した。IL-2 100 U/ml及び抗CD₃ Mo Abと共にインキュベートされたリンパ節集団は、IL-2のみと共にインキュベートされた培養よりも遥かに高い増加率を示した ($p < 0.00001$)。IL-2を含む培養へIL-4 (100-1000 U/ml)、インターフェロナー※

* 30人の患者からのリンパ節がCC49モノクローナル抗体により位置決めされ、種々の生物学的応答修正剤を用いてex vivoにて増加された。短期間の増加 (< 21日)の後の増加率 (即ち全リンパ球数の倍数) が表15に示されている。

【0106】

【表15】

※ γ (100-1000 U/ml)、シメチジン (100 μ g/ml)、若しくはインドメタシン (100 μ g/ml)を加えることは、如何なる時点に於ても増加及び表現型を有意に変化しなかった。表現型分析が、リンパ球の集団がこれらの培養条件にตอบสนองして如何に成長するかを同定するべく種々の時間に於て実行された。

【0107】

【表16】

表 16

培養されたリンパ節リンパ球の表現型

IL-2 1000 U/ml、IL-1 200 U/ml及びIL-2 100 U/ml、若しくはIL-2 100 U/ml及び抗CD₃ 0.1 μ g/mlにて増加させられたRIGSで位置決めされたLNLの表現型。結果は、FACSによる陽性に染色された細胞の平均パーセンテージ±SDで表わされている (n=6患者)。

| | CD4 | | CD8 | | CD10 | |
|---------------------------|----------|----------|--------|---------|-------|---------|
| | 0日 | 10日 | 0日 | 10日 | 0日 | 10日 |
| IL-2 | 74 ± 5.2 | 36 ± 2.4 | 14 ± 4 | 29 ± 12 | 7 ± 4 | 29 ± 5 |
| IL-1/IL-2 | 74 ± 5.2 | 44 ± 7.9 | 14 ± 4 | 33 ± 13 | 7 ± 4 | 23 ± 7 |
| IL-2/anti CD ₃ | 74 ± 5.2 | 76 ± 10 | 14 ± 4 | 15 ± 10 | 7 ± 4 | 7.7 ± 5 |

0日目に於てRIGSによって位置決めされた新鮮なLNLの表現型は、CD-4/CD8比に於て約5:1であった。CD4+優位表現型は、10日目に於てIL-2/抗CD₃セルに於て維持されたが、IL-2中に於て及びIL-1/IL-2中に於て培養されたLNLは

10日目に於てCD8+及びCD56+の表現型に移る傾向があった。表17は、5人の患者からの、IL-2/抗CD₃に於て増加されたLNLの特徴を示す。

【0108】

【表17】

表 17

RIGSにより位置決めされIL-2/抗CD₃
と共に培養されたLNLの表現型

種々の期間で、IL-2 100U/ml及び抗CD₃抗体0.1μg/mlで培養されたRIGSで位置決めされたリンパ節の表現型。データは、陽性に染色された細胞のパーセンテージの平均±SDで表わされている(n=5患者)。

| | 4日 | 7日 | 10日 | 14日 | 21日 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CD3 | 70±16 | 85±19 | 83±18 | 89±11 | 88±13 |
| CD4 | 64±17 | 74±13 | 79±21 | 78±14 | 66±12 |
| CD8 | 9±5 | 16±9 | 19±4 | 23±5 | 34±9 |
| CD56 | 4±3 | 6±4 | 5±4 | 3±4 | 2±2 |
| CD45RA | 13±5 | 4±6 | 13±8 | 11±9 | 13±6 |
| CD45RO | 42±11 | 74±12 | 51±13 | 78±10 | 80±8 |
| HLA-DR | 28±7 | 64±12 | 61±11 | 83±11 | 87±5 |

培養期間の初めに於て(<12日)、CD4+細胞増加は維持され、このことは10日までに約40倍の増加があることに関連している。培養期間が14日を越えると、CD8+細胞が生成され、CD:CD8細胞比が低減した。CD45RO+(メモリ)の増加が、活性化を示唆するHLA-DRの発現の増大と共に培養期間全体に互に見られる。B細胞(CD19)及び単球(Leu-M3)に関連した表現型は、10日後に検査された全ての培養に於て5%以下であった。

【0109】細胞毒性

これらの培養条件が細胞溶解性リンパ球の増殖を惹起すかどうかを評価するべく、細胞毒性がin vitroに於て測定された。オートローガス結腸腫瘍細胞に対する細胞毒性は7日目までに於て見られ、これは培養10日目以降徐々に僅かなレベルまで低減した。細胞溶解性T細胞の*30

表 18

| | 実験 1 | 実験 2 |
|----------|------------|------------|
| マイトジェン | 応答 (cpm) | 応答 (cpm) |
| 未処置 | 777±226 | 901±223 |
| IL-2 | 17337±3507 | 19283±3199 |
| IL-2+腫瘍 | 28527±3969 | 30962±4412 |
| IL-1+BSM | 25585±4941 | 30034±1130 |

これらの結果は、IL-2/抗CD₃にて増加された細胞がオートローガス腫瘍と溶解性ムチンとに应答して増殖する能力を維持しているということを示唆する。

【0112】IL-2生成

増加された細胞のサイトカイン分泌の能力を評価するべく、IL-2及び抗CD₃抗体中で増大されたプローブ

*長期間の成長は何れの検査された培養条件に於ても見られなかった。NK抵抗性ダウジ細胞に対する細胞溶解性は、培養期間に当り同様の反応態様を示し、このことは培養期間の初期に於ける細胞毒性がリンホカイン活性化キラー細胞(LAK)の活性に関連していることを示唆する。

【0110】増加されたLNLの増殖応答

増加された細胞の増殖の能力を評価するために、IL-2/抗CD₃中に於て培養されたLNLが、CC49エピトープを含むウシ上顎下ムチン(BSM)の存在下と共にオートローガス腫瘍の存在下に於て10日目に検査された。以下のデータが記録された。

【0111】

【表18】

により位置決めされたLNL(米国特許第4,782,840号の手順)が、0日目(増加前)及び10日目(増加後)に於けるIL-2生成について評価された。

【0113】

【表19】

表 19

IL-2/抗-CD₃と共に増加されたLNLのIL-2の生成

増加された細胞が、そのみで (NT) 若しくはPMA10 μ g/mlと共に12時間インキュベートされた。上澄みのIL-2の生成が、12時間に亘るCTL⁸H-チミジンの取込みにより測定された。結果は、4回の測定の平均 \pm S. D. で示されている。

全ての3つの実験に於て、PMAで刺激された10日間培養されたリンパ球のIL-2の生成は、0日目のものと比較して非常に高かった ($P < 0.0001$)。

| | 実験1 | | 実験2 | | 実験3 | |
|-----|----------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|
| | NT | PMA | NT | PMA | NT | PMA |
| 0日 | 1549 \pm 123 | 4187 \pm 416 | 1039 \pm 145 | 3626 \pm 1072 | 1522 \pm 428 | 10648 \pm 742 |
| 10日 | 3776 \pm 60 | 16919 \pm 2136 | 1796 \pm 472 | 15459 \pm 739 | 4997 \pm 258 | 21013 \pm 1307 |

IL-2と抗CD₃と共に10日間培養されたLNLは、in vitroに於てIL-2を分泌する能力を保持した。基準線の値は、患者によって変化することを反映しているが、増大された細胞をフォボールエステル (PMA 10ng/ml) により刺激することで、矛盾なく第0日に比較してIL-2の生成の有意な増大が見られた ($p = 0.0001$)。

【0114】サイトカインmRNA発現

RT-PCRを用いたLNLのサイトカインmRNA分析が、増加されたエフェクタのサイトカインを生成する潜在的能力を確認するために行われた。IL-2/抗CD₃に於て増加された10日目のLNLのサイトカインmRNAの発現が図9にて示されている。この培養された細胞集団は、種々のmRNA、例えばIL-2、IL-4、IL-5、IFN γ 及びTNF- β を発現した。パターンはTh 1及びTh 2の混合された集団を示唆する。

【0115】考察

養子細胞治療は、幾つかのガンに対しての臨床的な試みに於て有望であるということが示されているが、結腸直腸ガンは、通常あまり有効ではなかった。細胞の源、ex vivoに於ける活性化の方法、in vivoに於ける抗腫瘍活性の機構に関する文献は一致していない。養子細胞療法についての最適なエフェクタ細胞の特徴は確立されていないが、最近の成果によれば、養子として移入された細胞のin vivoに於ける有効性は、in vitroに於ける細胞毒性ではなくサイトカインを分泌する能力により関連しているということが示唆されている。(Barth, et al, "Interferon γ and tumor Necrosis Factor Have a Role in Tumor Regression Mediated by Murine CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes", J. Exp. Med., 173:647 (1991).)。本発明の成果には、TAG-72特異CC49モノクローナル抗体を用いて結腸直腸ガンを有する患者のin vivoに於ける微視的腫瘍及び放出された腫瘍ムチンに対して反応するリンパ節からのエフェクタを増加する方法を研究することを含んでいる。

【0116】腫瘍から分泌された因子に従属的な抑制を

避ける試みとして、米国特許第4,782,840号のシステムは、臨床的にオカルトである微視的腫瘍及び放出されたTAG-72を含む腫瘍から離れたリンパ節を同定することに用いられた。上記に示されたデータは、米国特許第4,782,840号により位置決めされたリンパ節が微視的転移性腫瘍及び放出された腫瘍抗原に応答してin vivoに於て活性化する良好なCD4+の源であるということを示している。これらの位置決めされたリンパ節は、CD45RA+「ナイーブ」が優位的である非関連のLNLに比べてCD45RO+「メモリ」細胞の割合が高いCD4+細胞増殖によって特徴付けられている。微視的腫瘍及び放出された抗原を有するこれらのLNLのマイトジェンに対するin vitroの増殖応答は、末梢血リンパ球、TIL、非関連リンパ節若しくは巨視的腫瘍を有するリンパ節に比べて非常に高く且より特異的である。

【0117】一連の事実は、これらのリンパ節によるTAG-72抗原の抗原特異的处理機能に一致する。抗体を以前に受けていない結腸直腸ガンを有する患者の腫瘍のないリンパ節の胚中心についての免疫組織化学的染色、即ち抗CEA抗体を有するこれらのリンパ節を染色する方法による免疫組織化学的研究では、同一の様式の抗原处理機能は示されなかった。更に、溶解性のTAG-72ムチンに対するこれらのリンパ節リンパ球のin vitroに於ける増殖は、それらがTAG-72に対しin vivoに於て感作されているということを示唆する。溶解性のCEAに対する同様の応答は見られてない。

【0118】検査された培養方法に於ては、その制限された培養時間及び条件の結果によるからかもしれないが、腫瘍特異CTL生成の証拠は得られていない。腫瘍ムチン特異性(CTL)はフィンとその共同研究者により膵臓ガンの患者の腫瘍排出リンパ節をIL-2及び繰返しの腫瘍細胞に対する刺激と共に培養することによって発展されている。(Finn, Chapter on "Pancreatic Tumor Antigens: Diagnostic Markets and Targets for Immunotherapy", pp 61-77, DeVita, et al. Important Advances in Oncology, J.B. Lippincott, Philadelphia,

PA(1992); 及びJerome, et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes Derived from Patients with Breast Adenocarcinoma Recognize an Epitope Present on the Protein Core of a Mucin Molecule Preferentially Expressed by Malignant Cells", *Cancer Res.*, 51:2908-2916, 1991; 及びBarnd, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, supra.)。これらのCTLは、ムチン特異的ではあるが、非MHC的に制限された態様にて細胞を殺した (Mariani-Constantini, et al., "Immunohistochemical Evidence of Immune Response to Tumor-Associated Antigens in Lymph Nodes of Colon Carcinoma Patients", *Cancer*, 67:2880(1991).)。米国特許第4, 782, 840号にて位置決めされたリンパ節リンパ球の培養に於てCD4+細胞が優位であるので、一般的に腫瘍標的に対する直接的な細胞毒性が低いということは驚かれることではない。米国特許第4, 782, 840号のシステムによって検出されたLNLがフィン等によって観察された如き非MHC的に制限された態様にてムチンコア蛋白質抗原を認識しているかどうかは現在研究されていることである。

【0119】非細胞溶解性のサイトカイン分泌T細胞の養子移入は、幾つかの動物モデルに於て散布されたガンを完全に根絶することを促進するということが示されている (Kahn, et al., "CD4 Cell Clones Specific for the Human p97 Melanoma-Associated Antigen Can Eradicate Pulmonary Metastases from Murine Tumor Expressing the p97 Antigen", *J. Immunol.*, 146:3225(1991);

及びForni, et al., "Helper Strategy in tumor Immunology: Expansion of Helper Lymphocytes and Utilization of Helper Lymphokines for Experimental and Clinical Immunotherapy", *Can. Metast. Rev.*, 7:289(1988).)。幾つかのサイトカインを分泌するT細胞は、CTL、多形核細胞、及び腫瘍を殺すマクロファージを含む種々の宿主-エフェクタ機構を活性化することが示されている。IL-2/抗CD₃中で増加された細胞に於てIL-2、IL-4、TNF- β 、及びIFN- γ のサイトカインmRNAが存在することは、細胞免疫応答及び体液免疫応答の両方を含み得る混合されたTh1及びTh2表現型を示唆する。これらの米国特許第4, 782, 840号により位置決めされたLNLによる増加に続くIL-2の有意な生成が観察されたことは、それ

らがin vivo に於てTヘルパー細胞として機能し得ることを示唆する。実験動物のモデルに於て腫瘍の発達及び退行の制御が観察されており、そこに於ては、予め宿主エフェクタを漸増することを介して遺伝子感染させられた腫瘍細胞によって低いレベルのIL-2及びIL-4が連続的に生成されている (Golumbek, et al., "Treatment of Established Renal Cancer by Tumor Cells Engineered to Secrete Interleukin-4", *Science*, 254:713(1991).)。

【0120】in vivo に於て特異腫瘍関連ムチンに対して反応するLNLを選択するべく放射性標識されたモノクローナル抗体を用いることによって、進行した結腸直腸ガンを有する患者に養子細胞免疫療法を用いる独特な機会が提供される。米国特許第4, 782, 840号による位置決めされたリンパ節の各々は約 5×10^8 の細胞を含んでいるので、20倍の増加により、質量当りに於て実験動物モデルで有効な細胞数が得られることになる。

【0121】ここに開示する新規な治療薬の腫瘍退行能力を示すために、以下のデータが提示される。このデータは、本発明を例示するものであり制限するものであると解釈されるべきではない。

【0122】例4

治療的過程

結腸直腸ガンの研究

この結腸直腸ガンの研究に於て27人の患者が登録された。各々の患者は¹²⁵I-CC49モノクローナル抗体を受け、その後米国特許第4, 782, 840号に教示される如く上記のように或る時間経過させられた。その後各々の患者は手術を受けた。3人の患者は患部が完全に切除できると判断され、従ってこの研究から除外された。残る24の患者は、切除できない疾患を有すると判断された。しかしながらリンパ節は決定され除去された。肉眼による視診によって腫瘍を含まないと決定されたこれらのリンパ節は、上記の態様にて増加された。患者はランダムに細胞のみ (IL-2がない状態) 若しくはIL-2を加えた細胞を投与された。以下のデータが記憶された。

【0123】

【表20】

表 20

| 患者 No. | 年齢 /性別 | RIGS 日付 | 細胞数 (10 ¹⁰) | IL-2 | 最良応答* | 備考 |
|-----------|-----------|------------|----------------------------|------|-------|--|
| 1 | 54/M | 11/20/92 | 1.4 | - | SD | 化学療法を4/93に始めた。 部分的な応答は5/93に 見られた。 |
| 2 | 55/F | 12/10/92 | 4.0 | - | PD | 進行性の疾患; 治療前に大きな 腫瘍に悩まされた。 (肝質量17×15cm) |
| 3 | 37/F | 1/8/93 | 2.4 | - | CR | 腫瘍は後退し続けた。 腫瘍は5×5cm 現在、硬化が 進んで<2cm (11/93) |
| 4 | 69/M | 1/29/93 | 3.3 | + | MR | 1ヶ月後肝転移に於て >20%低減 4/28/93に於て進行 化学療法 5/93に開始 部分的な応答 |
| 5 | 37/M | 2/18/93 | 4.3 | + | SD | CA-125が133(4/93) から62(6/93)減少 CEAは正常な制限内 (11/93) |
| 6 | 46/M | 3/5/93 | 7.3 | + | SD | 6/14/93に 肺に転移 |
| 7 | 50/M | 3/26/93 | NA | NA | NA | 完全に切除: 調査せず |
| 8 | 70/M | 4/9/93 | 4.3 | + | SD | 進行 9/8/93 |
| 9 | 54/M | 4/23/93 | 4.3 | + | PR | 盲腸見られず 6cm×6cm病変 (7/93) |
| 10 | 36/M | 6/18/93 | 3.2 | - | PD | 70%の肝臓が腫瘍に置換 (進行 8/25/93) |
| 11 | 70/F | 7/2/93 | 3.2 | + | SD | 進行 10/6/93 |
| 12 | 23/M | 7/9/93 | 1.7 | + | PD | 完了 9/2/93 |

【0124】

【表21】

| | | | | | | |
|----|------|----------|------|----|-----|--|
| 13 | 47/M | 7/23/93 | 0.6 | - | PD | 治療前大きな腫瘍 (11cm×12cm肝臓) 新しい病変 8/1/93 完了 12/24/93 |
| 14 | 53/M | 7/30/93 | 0.4 | - | SD | 進行 9/15/93 9/15から11/17 まで安定 |
| 15 | 58/F | 8/27/93 | NA | NA | NA | 完全に切除 調査せず |
| 16 | 55/M | 9/3/93 | 2.3 | - | SD | 調査完了 |
| 17 | 68/F | 9/24/93 | 1.1 | - | SD | 調査完了 |
| 18 | 66/M | 10/8/93 | 5.4 | + | SD | 2ヶ月後安定な疾患 |
| 19 | 65/M | 11/19/93 | 2.5 | + | SD | 2ヶ月後安定な疾患 |
| 20 | 63/M | NA | NA | NA | NA | 完全に切除 調査せず |
| 21 | 56/M | 2/25/94 | N/A | + | PD | 全病変増大 新しいLFTの安定なし |
| 22 | 52/M | 3/11/94 | N/A | + | SD | |
| 23 | 59/F | 4/15/94 | 0.49 | - | N/A | |
| 24 | 46/M | 4/22/94 | 0.16 | - | N/A | |
| 25 | 50/M | 5/6/94 | N/A | - | N/A | |
| 26 | 64/F | 5/13/94 | N/A | - | N/A | |
| 27 | 59/M | 5/27/94 | N/A | - | N/A | |

* CR-安全な応答; PR-部分的な応答; MR-小さい応答
SD-安定な疾患; PD-進行性疾患; NA-適用不可能

臨床的応答

2人の患者(No. 3及び4)は、外因性のIL-2がある状態及びない状態で腫瘍の退行が見られた。腫瘍の応答を分析する更なる調査はこの研究に於て現在もこれらの患者について継続中である。

【0125】毒性

治療は耐毒性的であった。細胞の注入に関連した困難はなかった。全ての患者は細胞注入の約1時間後から熱及び寒けを報告した。これらの現象は薬によって容易に解決された。自覚症状のない一過的な肝酵素の上昇が外因性のIL-2を受入れた患者に於て見られた。

【0126】免疫学的効果

表面表現型、サイトカインmRNA発現、及び増加された細胞の細胞毒性、オートローガス腫瘍に対するDTH応答(皮膚検査)、末梢血細胞毒性、末梢血細胞表現型、血清サイトカイン、¹¹¹In標識された細胞を用いた細胞追跡研究(患者No. 5)を含む詳しい免疫学的データが収集された。それらは決定的な結論を出すには焦燥である。

【0127】上記のデータは、CD4+リンパ球の豊富な決定されたリンパ節から由来する治療薬の有効性を明瞭に示している。患者4に於て見られた応答に基づく、本発明の治療薬を受けた患者に対し補助的な化学療法を施すことは、患者にとって、ここに開示された本発明の養子細胞療法を受ける前に化学療法に抵抗のあった患者に対しても特に有効であろう。このことは、適当に段階付けされた患者に対し補助的な化学療法を投与することに関するナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス(National Institute of Health(NIH))の合意の報告書("NIH Consensus Conference: Adjuvant Therapy for Patients with Colon and Rectal Cancer", JAMA, 1990; 264: 1444-50)から見て特に重要である。

【0128】ブロッカ等(Buroker, et al, "Randomized Comparison of Two Schedules of Fluorouracil and Leucovorin in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer", J. Clin. Oncol., Vol. 12, No. 1, pp 14-20 (January 1994))は、5FU/ルイコパリンの二つの異なる療法を受けた372人の患者が9.3ヶ月及び10.

7ヶ月（平均）生存したことを報告している。一方、スタングル等（Stangl, et al., "Factors Influencing the Natural History of Colorectal Liver Metastases", Lancet, 1994; 343:1405-10）は、484人の未処置の患者に於て、平均の生存が診断の時点から7.5ヶ月であり、局所的な若しくは系統的な化学療法を受けた患者について平均の生存期間は各々12.7ヶ月及び11.1ヶ月であったことを報告した。図12は、新規な治療薬の投与の後、生存した患者の数（表20参照）とかかる投与の後の時間との関係を示すグラフである。これらの結果は予備的なものであり少数の患者に対するものであるが患者にとって利点があるように見られる。

【0129】膵臓ガンについての研究

*
表 21

| 患者 No. | 年齢 /性別 | RIGS 日付 | 細胞数 (10 ¹⁰) | IL-2 | 最良応答* | 備考 |
|-----------|-----------|------------|----------------------------|------|-------|----|
| 1. | 62/F | 4/1/94 | N/A | - | PD | |
| 2 | 69/F | 4/1/94 | N/A | + | N/A | |

* CR=安全な応答; PR=部分的な応答; MR=小さい応答
SD=安定な疾患; PD=進行性疾患; NA=適用不可能

【図面の簡単な説明】

【図1】 [³H] チミジンを取込みにより測定された IL-2 及び種々の濃度の抗CD₃ の存在下に於てオートローガス（照射された）腫瘍と共に混合された腫瘍リンパ球培養に於けるタイプI LNLの増殖を示すグラフ図。同一のデータは表2に示されている。LNL（10⁴ 細胞）は、新鮮な腫瘍から分離されたオートローガス（Auto）若しくは異型的（Allo）の結腸ガン細胞と共に若しくはオートローガス若しくは異型的PBL（5×10³ 細胞、4000radsにて照射された）と共に96のウェルプレートに於て培養された。4日間の後 [³H] チミジン（1 μCi/ウェル）が加えられ、18時間後に、プレートは採取され、液体シンチレーション計数法によりチミジンの取込みが決定された。全ての培養液は20 u/ml IL-2を含む。腫瘍とLNLのみの、成長因子と腫瘍細胞のみ、若しくはLNLのみの各々をインキュベーションした場合、増殖は見られなかった。

【図2】タイプI LNLに於ける混合された腫瘍リンパ球培養を刺激した際のIL-2に対するIL-2と抗CD₃ の比較を示すグラフ図。同一のデータが表3に示されている。タイプI LNL（10⁴ 細胞）は、種々の濃度のIL-2のみ存在する場合若しくはIL-2（20 u/ml）及び抗CD₃（50 ng/ml）の存在する場合に於て照射されたオートローガス腫瘍（5×10³）と共に培養された。培養は、96時間後 [³H] チミジンをもってパルス標識され、18時間の後採取された。計数

* これまでにこの膵臓ガンについての研究に於て2人の患者が登録された。各々の患者は¹²⁵I CC49モノクローナル抗体を受け、米国特許第4,782,840号に教示されている如くある時間経過させられた。各々の患者はその後、手術を受けた。これら2人の患者は切除不可能な患部を有すると判断された。しかしながらリンパ節は決定され除去された。肉眼での視診によって腫瘍を含んでいないと判断されたリンパ節は、その後上記の態様にて増加された。患者はランダムに細胞のみ（IL-2を含まない状態）若しくはIL-2と共に細胞を投与された。以下のデータが得られた。

【0130】

【表22】

は液体シンチレーション計数法によって決定された。

【図3】タイプIII LNLの混合された腫瘍リンパ球培養を示すグラフ図。同一のデータが表4に示されている。LNL（10⁴ 細胞）は、オートローガス若しくは異型的（5×10³、4000rads）ヒト結腸ガン腫細胞、IL-2（20 u/ml）及び種々の濃度の抗CD₃ の存在下に於て96時間培養された。 [³H] チミジン（1 uCi/ウェル）を添加した18時間の後に細胞は採取され、チミジンの取込みが液体シンチレーション計数法によって決定された。

【図4】タイプ0 LNLの混合された腫瘍リンパ球培養を示すグラフ図。同一のデータが表5に示されている。LNL（10⁴ /ウェル）がオートローガス若しくは異型的ヒト結腸ガン腫細胞（5×10³ /ウェル、4000rads）、20 u/ml IL-2及び種々の濃度の抗CD₃ と共に96時間培養された。96時間の後 [³H] チミジンが加えられ（1 uCi/ウェル）、18時間の後、プレートは採取され液体シンチレーションカウンタによりチミジンの取込みが決定された。

【図5】結腸直腸ガンを有する同一の患者からのタイプI LNLのタイプ0 LNLとの比較を示すグラフ図。同一のデータが表4に模式的に示されている。タイプI 及びタイプ0のLNL（10⁴ /ウェル）は、20 u/ml IL-2及び抗CD₃（50 ng/ml）と共にオートローガス結腸ガン腫細胞（5×10³ /ウェル、4000rads）の存在下に於て96時間培養された。96時間の

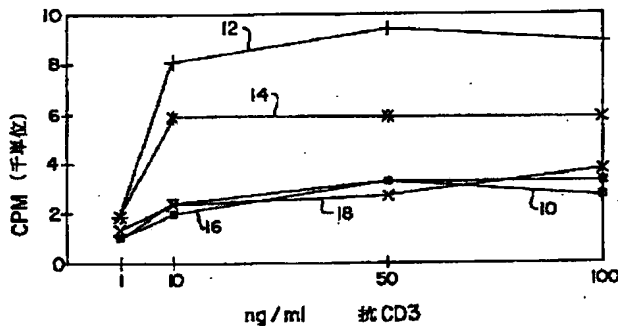
61

後 [^3H] チミジンが1 uCi/ウェルだけ加えられプレートは18時間後に採取された。

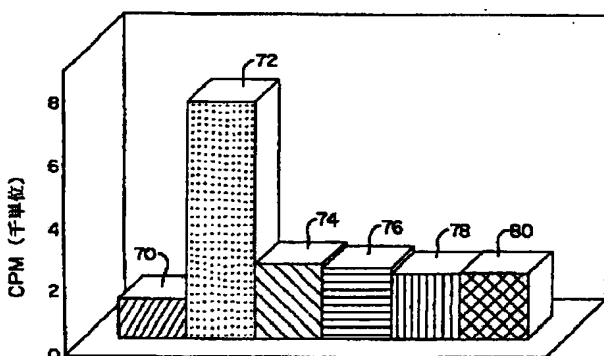
【図6】タイプI 及びタイプIII の脾細胞の混合された腫瘍リンパ球培養を示すグラフ図。同一のデータが表6に示されている。脾細胞 (10^4 細胞/ウェル) が、オートローガス若しくは異型の結腸ガン腫細胞 (5×10^3 /ウェル、照射された細胞) の存在下に於て96時間インキュベートされた。タイプIII の脾細胞の場合、二つの異形的腫瘍が用いられた。培養は全て20 u/ml IL-2 及び種々の濃度の抗CD3 を含んでいた。96時間の後、 [^3H] チミジン (1 uCi/ウェル) が加えられ18時間の後プレートが採取されチミジンの取込みが決定された。

【図7】混合された腫瘍リンパ球培養に於てタイプI LNL を刺激した際の種々の腫瘍の比較を示すグラフ図。同一のデータが表6に示されている。タイプI からのLNL (10^4 /ウェル) がオートローガス結腸ガン細胞、ヒトグリオーマ (Glio) 培養細胞系統、肝臓移植を受けた患者から採取したヒトカルシノイド (CAR1) 腫瘍、培養されたヒト結腸ガン腫細胞系統 (WD124) 及びオートローガスPBLの存在下に於てIL-2 (20 u/ml) 及び抗CD3 (50 ng/ml) と共に培養*

【図1】



【図7】



62

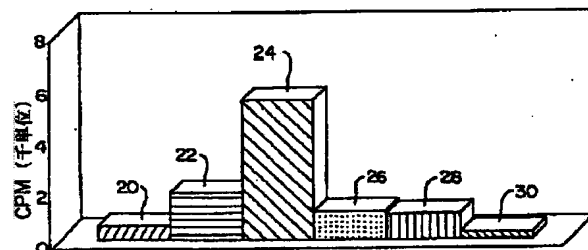
*された。96時間の後 [^3H] チミジンが加えられ (1 uCi/ウェル)、細胞は18時間後に採取された。 [^3H] チミジンの取込みは、液体シンチレーション計数法によって決定された。成長因子なしで腫瘍と共にLNLを培養したもの若しくは成長因子の存在下での任意の腫瘍のみの培養に於ては増殖が刺激されなかった。LNLは、IL-2 (20 u/ml) 及び抗CD3 (50 ng/ml) だけと共に培養されたタイプI である。

【図8】二つの異なる組の分裂促進刺激状態に於て培養された増加されたLNL細胞若しくはオートローガス腫瘍若しくは異型の腫瘍の存在下に於て培養された増加されたLNL細胞による細胞壊死因子 (TNF) アルファの生成を示すグラフ図。

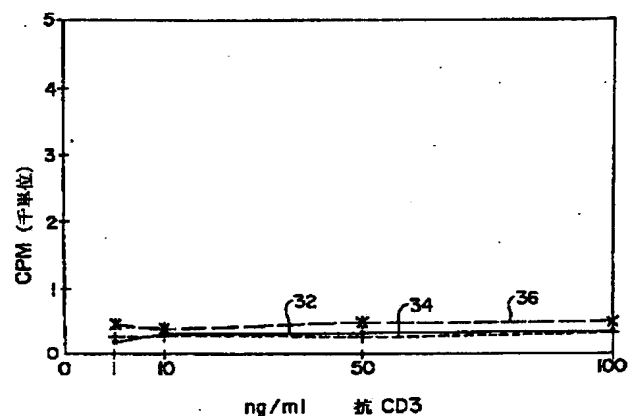
【図9】10日後に於けるIL-2 (100 U/ml) と抗CD3 抗体 (0.1 μg /ml) に於て培養された局所的な細胞のサイトカイン mRNAの発現を示す図。サイトカイン mRNAは逆転写と複製連鎖反応 (PCR) を用いて増幅された cDNAとによって分析された。レーンM=123bp分子量ラダー (Gibco / BRL)。

【図10】新規な治療薬を受けた後の患者の生存のパーセンテージとかかる治療薬の投与の後の時間 (月) との関係を示すグラフ図。

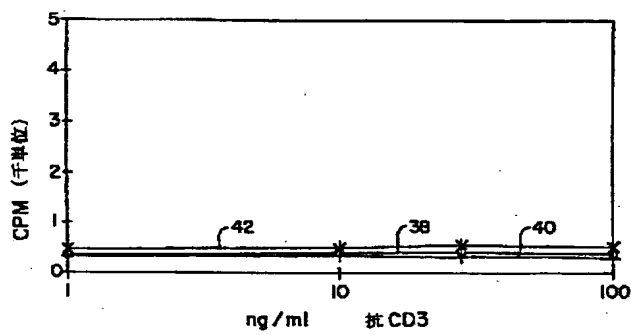
【図2】



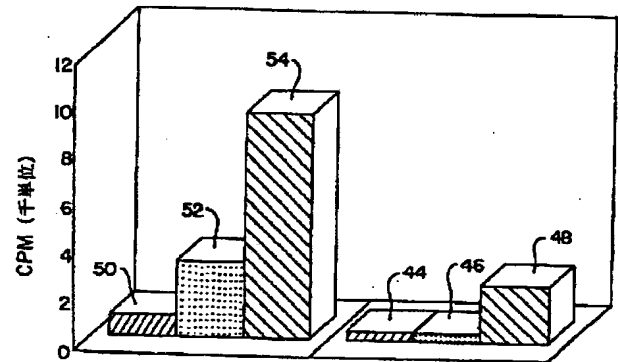
【図3】



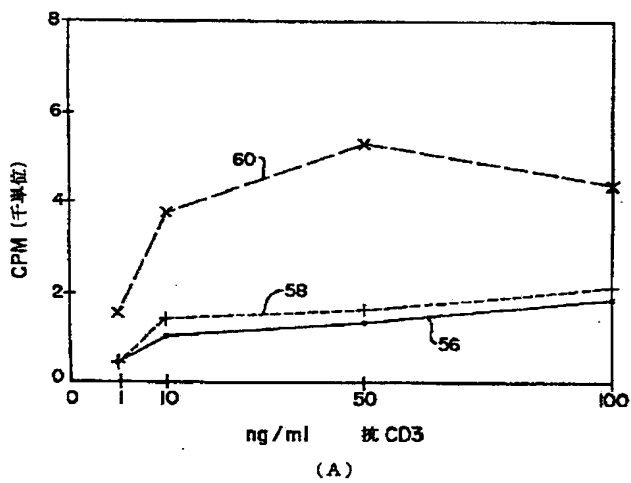
【図4】



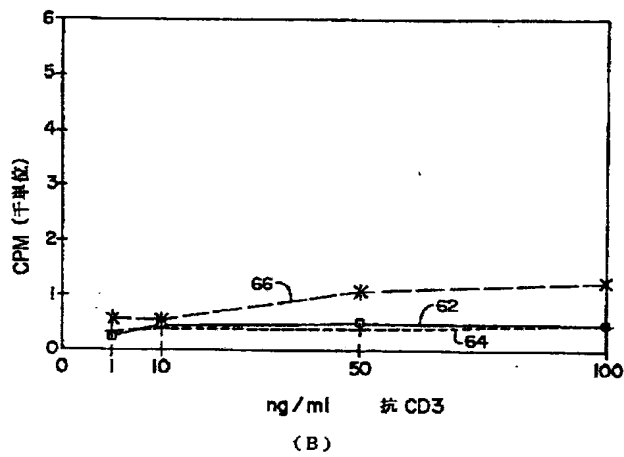
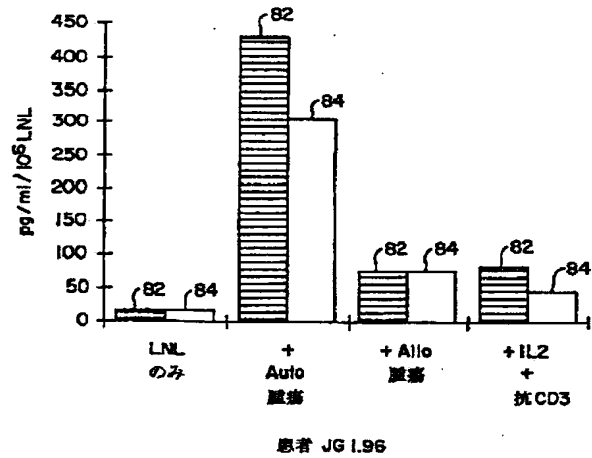
【図5】



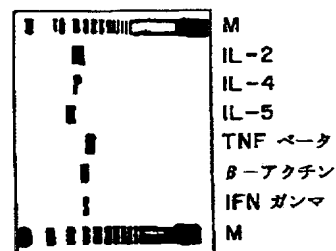
【図6】



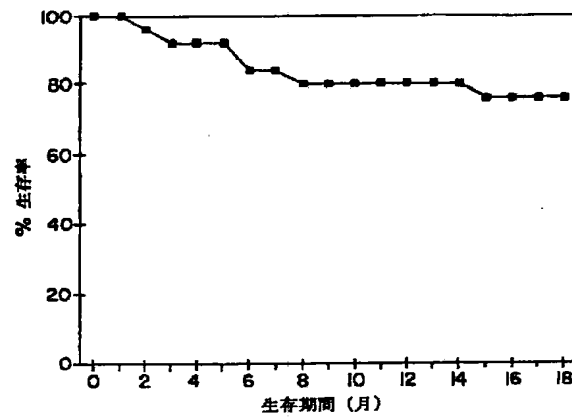
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

| | | | | |
|----------------------------|------|---------------|-----|--------|
| (51) Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 0 7 K 16/30 | | 8318-4H | | |
| C 1 2 N 5/06 | | | | |
| G 0 1 N 33/574 | A | | | |
| | D | | | |
| // A 6 1 K 38/00 | | | | |
| 39/395 | E | | | |
| | T | | | |
| | | A 6 1 K 37/02 | | |

(72) 発明者 エドワード・ダブリュ・マーティン・ジュニア
 アメリカ合衆国 43015 オハイオ州、デラウェア、ブライドルスパー・レーン
 7799

(72) 発明者 ブライアン・ジェイ・ツェルニーキ
 アメリカ合衆国 20879 メリーランド州、ゲイサーズバーグ、タンヤード・ヒル・ロード 1536

(72) 発明者 ピエール・エル・トリオッツィ
 アメリカ合衆国 43201 オハイオ州、コロンバス、ウェスト・セヴンス・アヴェニュー 360

(72) 発明者 ジュリアン・エイ・キム
 アメリカ合衆国 43202 オハイオ州、コロンバス、ダブリュ・ブライトン・ロード 187

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-179352

(43)Date of publication of application : 18.07.1995

(51)Int.Cl.

A61K 35/26
A61K 35/28
A61K 51/00
C07K 16/30
C12N 5/06
G01N 33/574
// A61K 38/00
A61K 39/395

(21)Application number : 06-187828

(71)Applicant : UNIV OHIO

(22)Date of filing : 18.07.1994

(72)Inventor : MARTIN EDWARD W JR
CZERNIECKI BRIAN J
TRIOZZI PIERRE L
KIM JULIAN A

(30)Priority

Priority number : 93 93088
94 271902

Priority date : 16.07.1993
13.07.1994

Priority country : US
US

(54) THERAPEUTIC AGENT IN ADOPTIVE CELLULAR THERAPY USING LYMPH NODE RICH IN TUMOR REACTIVE CELL AND TREATMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To determine a lymph node rich in tumor reactive cell and to treat cancers by adoptive immunity therapy.

CONSTITUTION: A lymph node rich in tumor specific lymphocyte containing CD4 + tumor specific lymphocyte is determined. An effective amount of the lymph node which is formed by a neogenetic tissue is administered to a radioactive labeled locator. Then, a time to increase the ratio of photon release from the neogenetic tissue is passed and a patient is examined by a radiation detecting probe. The determined lymph node is removed, a lymph node visually not containing the evidence of tumor among the removed lymph node is selected and the lymph node is cultured by mitogenic activity stimulation to proliferate a tumor specific lymphocyte. The lymph node is cultured in the presence of interleukin 2 and an anti-CD3 monoclonal antibody. A lymph node rich in tumor reactive cell is surely selected and a diseased tissue can be removed from a patient by eliminating a lymph node to readily increase a tumor reactive cell.